

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

**Камышный А.М., Топол И.А.,
Полищук Н.Н., Лесничая А.Н., Деген А.С., Букина Ю.В.**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ
ИНОСТРАННЫХ СТУДЕНТОВ ПРИ ПОДГОТОВКЕ К ПРАКТИЧЕСКИМ
ЗАНЯТИЯМ ПО МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И ИММУНОЛОГИИ

Часть III

Модуль №1. Общая и специальная вирусология

Запорожье - 2019

Авторы: Камышный А.М. - профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ЗГМУ, доцент Полищук Н.Н., старший преподаватель Топол И.А., старший преподаватель Лесничая А.Н., ассистент Деген А.С., ассистент Букина Ю.В.

Под редакцией заведующего кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожского государственного медицинского университета, профессора **Камышного А.М.**

Методические указания для самостоятельной работы студентов при подготовке к практическим занятиям по микробиологии, вирусологии и иммунологии одобрены цикловой методической комиссией по медико-биологическим дисциплинам Запорожского государственного медицинского университета от _____ 2019 года, протокол № _____.

Содержание:

1. Практическое занятие № 13. Вирусологическая лаборатория. Морфология и ультраструктура вирусов и принципы классификации. Вирусологические методы исследования. Культивирование вирусов в культуре клеток и куриных эмбрионах. Индикация вирусной репродукции.....	5
2. Практическое занятие № 14. Противовирусный иммунитет. Иммунные реакции в вирусологии: реакция гемагглютинации, гемадсорбции, реакция торможения гемагглютинации, реакция нейтрализации. Иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА), иммунный блоттинг (ИБ), прямая и косвенная иммунофлюоресценция (РИФ), иммунохроматографический анализ (ИХА). Иммунология опухолей.....	19
3. Практическое занятие № 15. Субмодуль 2 по иммунологии и общей вирусологии.....	30
4. Практическое занятие № 16. Лабораторная диагностика гриппа и парагриппа. Лабораторная диагностика респираторно-синцитиальной, риновирусной и аденовирусной инфекции. Лабораторная диагностика паротита, кори, краснухи.....	32
5. Практическое занятие № 17. Лабораторная диагностика герпетической инфекции, ветряной оспы и натуральной оспы. Лабораторная диагностика полиомиелита и заболеваний, которые вызывают вирусы Коксаки и ЕСНО.....	39
6. Практическое занятие № 18. Лабораторная диагностика гепатитов А, В, С, Д, Е, F, G. лабораторная диагностика бешенства и арбовирусных инфекций.....	48
7. Практическое занятие № 19. Вирус иммунодефицита (СПИД). Принципы и методы лабораторной диагностики. Онковирусы. Вирусно-генетическая теория происхождения опухолей.....	62
8. Практическое занятие № 20. Итоговый модульный контроль	67

Теми практичних занять

Модуль 1.

№ завдань	Назва теми	Кількість годин
13	Вірусологічна лабораторія. Морфологія і ультраструктура вірусів та принципи класифікації. Вірусологічні методи дослідження. Культивування вірусів у культурі клітин та курячих ембріонах. Індикація вірусної репродукції.	2
14	Противірусний імунітет. Імунні реакції в вірусології: реакція гемаглютинації, гемадсорбції, реакція гальмування гемаглютинації, реакція нейтралізації. Імуноферментний аналіз (ІФА), радіоімунний аналіз (РІА), імунний блотинг (ІБ), пряма і непряма імунофлюоресценція (РІФ), імунохроматографічний аналіз (ІХА). Імунологія пухлин.	2
15	Субмодуль 2 з імунології та загальної вірусології.	2
16	Лабораторна діагностика грипу та парагрипу. Лабораторна діагностика респіраторно-сінцитіальної, ріновірусної та аденовірусної інфекції. Лабораторна діагностика паротиту, кору, краснухи.	2
17	Лабораторна діагностика герпетичної інфекції, вітряної віспи та натуральної віспи. Лабораторна діагностика поліомієліту та захворювань, що спричиняють віруси Коксаки та ЕСНО.	2
18	Лабораторна діагностика гепатитів А, В, С, Д, Е, F, G. Лабораторна діагностика сказу та арбовірусних інфекцій.	2
19	Віруси імунодефіцитів (СНІД). Принципи та методи лабораторної діагностики. Онковіруси. Вірусно-генетична теорія походження пухлин.	2

Практическое занятие №13

Тема: Вирусологическая лаборатория. Морфология и ультраструктура вирусов и принципы классификации. Вирусологические методы исследования. Культивирование вирусов в культуре клеток и куриных эмбрионах. Индикация вирусной репродукции.

Актуальность темы:

Вирусы являются этиологическим фактором большой группы инфекционных заболеваний, разнообразных по клиническим проявлениям и течению, характеризующихся высокой контагиозностью и способностью вызывать эпидемии и пандемии. На данное время вирусология, еще недавно бывшая узкой дисциплиной, является одной из интенсивно развивающихся медико-биологических наук.

Важность вирусологии определяется, в первую очередь, ведущей ролью вирусов в инфекционной патологии человека. Их удельный вес растет по мере снижения заболеваемости бактериальными, грибковыми и протозойными инфекциями на фоне ограниченности средств специфической химиотерапии. Во-вторых, на моделях вирусов (как наиболее просто организованных форм жизни) решают много фундаментальных вопросов биологии и молекулярной генетики (например, учение об интронах, сплайсинге и онкогенах). Одним из важнейших вкладов вирусологии в современную науку считают открытие обратной транскриптазы, использование которой лежит в основе генной инженерии.

Знание данной темы является необходимым для понимания патогенеза вирусных заболеваний на клинических кафедрах. В практической работе врача это важно для клинико-морфологической дифференциальной диагностики вирусных и других инфекционных заболеваний. На занятии студентам предоставляется возможность овладеть методами культивирования культур клеток, инфицирования культур клеток вирусосодержащим материалом. Все это необходимо для формирования у студентов представления о методах диагностики вирусных заболеваний.

Конкретные цели:

- Трактовать морфологию и ультраструктуру вирусов.
- Анализировать особенности взаимодействия вирусов с живыми системами.
- Оценивать результаты размножения вирусов в живых системах.
- Анализировать методы культивирования вирусов в лабораторных условиях.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Вирус	Вирус - неклеточная форма жизни, характеризующаяся малыми размерами, отсутствием собственных белок-синтезирующих и энергогенерирующих систем, а также облигатным внутриклеточным паразитизмом. Вирусы существуют в двух качественно различных формах: внеклеточной - вирион и внутриклеточной – вегетативный вирус.

Нуклеокапсид	Белковая оболочка (капсид), вместе с молекулой одного типа нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), которую она окружает, называется нуклеокапсидом. Капсиды образованы из белковых субъединиц (полипептидов), которые называют капсомерами.
Суперкапсид	Суперкапсид (пеплос) - внешняя оболочка сложных вирусов, содержащая липиды и пронизанная вирусоспецифическими белками гликопротеидами. Структурной субъединицей суперкапсидной оболочки является пепломер.
Продуктивная инфекция	Тип взаимодействия вируса и клетки, при котором вирус функционирует в клетке автономно, а его репродукция происходит независимо от репродукции клеточного генетического аппарата. При этом образуется новое поколение инфекционных вирусов.
Абортивный тип взаимодействия вируса с клеткой	Цикл репродукции вирусов блокируется на одной из стадий, а инфекционные вирионы не образуются.
Интегративный тип взаимодействия вируса с клеткой	Характерен для онкогенных РНК- и ДНК-геномных вирусов. Их нуклеиновая кислота интегрируется в клеточную хромосому и существует там в виде провируса. В результате могут меняться наследственные свойства клетки. Такой процесс объединения вирусной нуклеиновой кислоты с хромосомой клетки-хозяина называется вирогенией.
Дефектные вирусы	Дефектные вирусы - это вирусы, потерявшие в процессе репродукции часть своего генома. Их разделяют на 4 группы: дефектные интерферирующие частицы, интегрированные геномы, вирусы-спутники и псевдовирионы.

Теоретические вопросы к занятию:

- Современное определение вирусов.
- Современные взгляды на природу и происхождение вирусов. Место вирусов в системе живого.
 - История открытия и главные этапы развития вирусологии. Вклад отечественных ученых.
 - Принципы классификации вирусов. Основные свойства вирусов человека и животных.
 - Морфология и ультраструктура вирусов. Типы симметрии вирусов. Химический состав, функции компонентов вирусов.
 - Репродукция вирусов. Этапы и виды взаимодействия вирусов с чувствительными клетками.
 - Бактериофаг, история изучения. Структура, классификация фагов по морфологии. Методы качественного и количественного определения бактериофагов. Практическое использование бактериофагов.

- Формы взаимодействия бактериофагов с бактериальной клеткой. Вирулентные и умеренные фаги. Характеристика продуктивного взаимодействия. Лизогения и фаговая конверсия.

Практические задания, выполняемые на занятии:

1. Изучить морфологические и структурные особенности вирусов, их взаимодействие с клетками.
2. Охарактеризовать методы культивирования вирусов.
3. Ознакомиться с клеточными культурами, их использованием в вирусологии, а также питательными средами для выращивания клеток.
4. Осуществить инфицирование клеточных культур вирусосодержащим материалом. Освоить методы подготовки материала для вирусологического исследования.

Содержание темы:

На практическом занятии студенты знакомятся с методикой забора, обработки и транспортировки материала для вирусологического исследования, приготовлением материала для инфицирования живых систем; изучают образцы питательных сред, растворов и сывороток, которые используются при работе с клеточными культурами; изучают на демонстрационных препаратах различные виды культур клеток, используемые в вирусологии; сравнивают методы культивирования вирусов в различных чувствительных системах (клеточных культурах, куриных эмбрионах, чувствительных лабораторных животных); проводят инфицирование культуры клеток, куриных эмбрионов и лабораторных животных вирусосодержащим материалом. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Вирусы - особое царство организмов ультрамикроскопических размеров, обладающих только одним типом нуклеиновых кислот, лишенные собственных систем синтеза белка и мобилизации энергии и поэтому являются абсолютными *внутриклеточными паразитами*. В 1892 русский ученый-ботаник Д.И. Ивановский, изучая мозаичную болезнь листьев табака, установил, что это заболевание вызывается мельчайшими микроорганизмами, которые проходят через мелкопористый бактериальные фильтры. Эти микроорганизмы получили название вирусы (от лат. *Virus* - яд). Большой вклад в изучение вирусов внесли вирусологи: М.А. Морозов, Н.Ф. Гамалея, Л. Зильбер, М.П. Чумаков, А. А. Смородинцев, В.М. Жданов и др.

Вирусы - мельчайшие микробы («фильтрующиеся агенты»), не имеют клеточного строения, белок-синтетической системы, содержащие один тип нуклеиновой кислоты (только ДНК или РНК). Вирусы, будучи облигатными внутриклеточными паразитами, репродуцируются в цитоплазме или ядре клетки. Они являются автономными генетическими структурами и отличаются особым, разобщенным (дизъюнктивным) способом репликации (репродукции): в клетке отдельно синтезируются нуклеиновые кислоты вирусов и их белки, затем происходит их сборка в вирусные частицы. Сложившаяся вирусная частица называется вирионом.

Основными свойствами вирусов являются:

1. Ультрамикроскопические размеры;
2. Содержание нуклеиновой кислоты только одного типа (ДНК или РНК)
3. Отсутствие способности к росту и бинарному делению;
4. Репликация путем воспроизведения себя из собственной нуклеиновой кислоты генома;
5. Отсутствие собственных систем мобилизации энергии;
6. Отсутствие белок-синтезирующих систем;
7. Вирусы - абсолютные внутриклеточные паразиты.

Морфологию и структуру вирусов изучают с помощью электронной микроскопии, поскольку их размеры малы и сравниваются с толщиной оболочки бактерий. Различают **простые** (например, вирусы полиомиелита, гепатита А) и **сложные** вирусы (например, вирусы кори, гриппа, герпеса, коронавируса). У простых вирусов нуклеиновая кислота связана с белковой оболочкой, называемой капсидом (от лат. *capsa* - футляр). *Капсид* состоит из повторяющихся морфологических субъединиц - *капсомеров*. Нуклеиновая кислота и капсид взаимодействуют друг с другом и вместе называются *нуклеокапсидом*. У сложно устроенных вирусов капсид окружен липопротеиновой оболочкой - *суперкапсидом*, или *пеплосом*. Оболочка вируса является производной структурой от мембран вирус-инфицированной клетки. На оболочке вируса расположены гликопротеиновые «шпильки», или «шипики» (пепломеры, или суперкапсидные белки). Под оболочкой некоторых вирусов находится М-белок. Таким образом, простые вирусы состоят из нуклеиновой кислоты и капсида. Сложные вирусы состоят из нуклеиновой кислоты, капсида и липопротеиновой оболочки. Вирионы имеют спиральный, икосаэдрической (кубический) или сложный тип симметрии капсида (нуклеокапсида). Спиральный тип симметрии обусловлен винтообразной структурой нуклеокапсида (например, у вирусов гриппа, коронавируса). Икосаэдрический тип симметрии обусловлен образованием изометрического полого тела из капсида, содержащего вирусную нуклеиновую кислоту (например, у вируса герпеса). Капсид и оболочка (суперкапсид) защищают вирионы от воздействия окружающей среды, обуславливают избирательное взаимодействие (адсорбцию) с определенными клетками, а также антигенные и иммуногенные свойства вирионов. Внутренние структуры вирусов называют сердцевиной. У аденовирусов сердцевина состоит из гистоноподобных белков, связанных с ДНК, у реовирусов - из белков внутреннего капсида. Форма вирионов может быть различной: палочковидной (ортомиксовирусы, парамиксовирусы, коронавируса), пулевидной (рабдовирусы), сферической (вирусы полиомиелита, ВИЧ, аденовирусы), нитевидной (филовирусами), в виде сперматозоида (бактериофаги).

Размеры вирусов определяют с помощью электронной микроскопии, методом ультрафильтрации через фильтры с известным диаметром пор, методом ультрацентрифугирования. Наиболее мелкими вирусами являются парвовирусы (18 нм) и вирус полиомиелиту (около 20 нм), наиболее крупным - вирус натуральной оспы (около 350 нм).

Различают вирусы, содержащие ДНК или РНК. Они обычно гаплоидные, то есть имеют один набор генов. Исключением является ретровирусы, имеющие диплоидный геном. Геном вирусов содержит от шести до нескольких сотен генов и представлен

различными видами нуклеиновых кислот: двухнитевыми, однонитевыми, линейными, кольцами, фрагментированными. Среди РНК-содержащих вирусов различают вирусы с положительным (плюс-нить РНК) геномом. Плюс-нить РНК этих вирусов выполняет наследственную (геномной) функцию и функцию информационной РНК (иРНК). Есть также РНК-содержащие вирусы с отрицательным (минус-нить РНК) геномом. Минус-нить РНК этих вирусов выполняет только наследственную функцию. Геном вирусов способен включаться в геном клетки в виде *провируса*, проявляя себя, как генетический паразит клетки. Нуклеиновые кислоты некоторых вирусов, например, вирусов герпеса, могут находиться в цитоплазме инфицированных клеток, напоминая плазмиды.

Вирусные белки подразделяют на:

1) *геномные* – нуклеопротеиды. Обеспечивают репликацию вирусных нуклеиновых кислот и процессы репродукции вируса. Это ферменты, за счет которых происходит увеличение количества копий материнской молекулы, или белки, с помощью которых на матрице нуклеиновой кислоты синтезируются молекулы, обеспечивающие реализацию генетической информации;

2) *белки капсидной оболочки* – простые белки, обладающие способностью к самосборке. Они складываются в геометрически правильные структуры, в которых различают несколько типов симметрии: спиральный, кубический (образуют правильные многоугольники, число граней строго постоянно) или смешанный;

3) *белки суперкапсидной оболочки* – это сложные белки, разнообразные по функции. За счет них происходит взаимодействие вирусов с чувствительной клеткой. Выполняют защитную и рецепторную функции.

Среди белков суперкапсидной оболочки выделяют:

- а) якорные белки (одним концом они располагаются на поверхности, а другим уходят в глубину; обеспечивают контакт вириона с клеткой);
- б) ферменты (могут разрушать мембраны);
- в) гемагглютинины (вызывают гемагглютинацию);
- г) элементы клетки хозяина.

В вирусологии используют следующие таксономические категории: семейство (название заканчивается на *viridae*), подсемейство (название заканчивается на *virinae*), род (название заканчивается на *virus*). Однако названия родов и особенно подсемейств не для всех вирусов. Вид вируса не получил биномиального названия, как у бактерий.

В основу классификации вирусов положены следующие категории:

- тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), ее структура,
- количество нитей (одна или две),
- особенности воспроизведения вирусного генома,
- размер и морфология вирионов,
- количество капсомеров и тип симметрии нуклеокапсида,
- наличие оболочки (суперкапсида),
- чувствительность к эфиру и дезоксихолату,
- место репродукции в клетке,
- антигенные свойства и др.

Другими необычными агентами, близкими к вирусам, являются **вириоды** - небольшие молекулы кольцевой РНК, суперспирализованы, они не содержат белка и вызывают заболевания растений.

Различают три типа взаимодействия вируса с клеткой: продуктивный, abortивный и интеграционный.

Строение и жизненный цикл вирусов

Вирусы представляют собой неклеточную форму жизни. Они неспособны к самостоятельному размножению и обмену веществ, поэтому для реализаций этих функций вирусам необходима клетка-хозяин. Вирусы были обнаружены двадцативосьмилетним русским ученым Д.И. Ивановским в 1892 г. Еще будучи студентом Петербургского университета (1887), Д.И. Ивановский начал изучать причины, вызывающие заболевание табака, при котором на листьях последнего появлялась мозаика.

Строение вирусов. Как мы уже говорили, вирусы не имеют клеточного строения. Каждая вирусная частица устроена очень просто - она состоит из расположенного в центре носителя генетической информации и оболочки. Генетический материал представляет собой короткую молекулу нуклеиновой кислоты, это *сердцевину* вируса. Нуклеиновая кислота у разных вирусов может быть представлена ДНК или РНК, причем эти молекулы могут иметь необычное строение: встречается однонитчатая ДНК и двухнитчатая РНК. Оболочка называется *капсид*. Она образована субъединицами - *капсомерами*, каждый из которых состоит из одной или двух белковых молекул. Число капсомеров для каждого вируса строго постоянно (например, в капсиде вируса полиомиелита их 60 - не больше и не меньше, а у вируса табачной мозаики - 2130, причем не 2129 и не 2131). Иногда нуклеиновая кислота вместе с капсидом называется *нуклеокапсидом*. Если вирусная частица, кроме капсида, больше не имеет оболочки, ее называют *простым* вирусом, если имеется еще одна - наружная, вирус называется *сложным*. Наружную оболочку также называют *суперкапсидом*, генетически она не принадлежит вирусу, а происходит из плазматической мембраны клетки-хозяина и формируется при выходе собранной вирусной частицы из инфицированной клетки. Таким образом, вирусная частица состоит только из двух классов биополимеров: нуклеиновых кислот и белков, тогда как в любой клетке в обязательном порядке должны присутствовать еще полисахариды и липиды.

У каждого вируса капсомеры капсида располагаются в строго определенном порядке, благодаря чему возникает определенный тип симметрии. При *спиральной симметрии* капсид приобретает трубчатую (вирус табачной мозаики) или сферическую (РНК-содержащие вирусы животных) форму. При *кубической симметрии* капсид имеет форму икосаэдра (двадцатигранника), такой симметрией обладают изометрические вирусы. В случае *комбинированной симметрии* капсид обладает кубической формой, а расположенная внутри нуклеиновая кислота уложена спирально. Правильная геометрия капсида даже позволяет вирусным частицам совместно образовывать кристаллические структуры.

Жизненный цикл вирусов. Вирусы не могут самостоятельно размножаться и осуществлять обмен веществ. В соответствии с этим у них различают две жизненные формы: покоящаяся внеклеточная - *вирион* и активно репродуцирующаяся внутриклеточная - *вегетативная*. Вирионы демонстрируют отменную жизнеспособность. В частности, они выдерживают давление до 6000 атм и переносят

высокие дозы радиации, однако погибают при высокой температуре, облучении ультрафиолетовыми лучами, а также воздействию кислот и дезинфицирующих веществ. Взаимоотношения вируса с клеткой последовательно проходят несколько стадий (рис. 1).

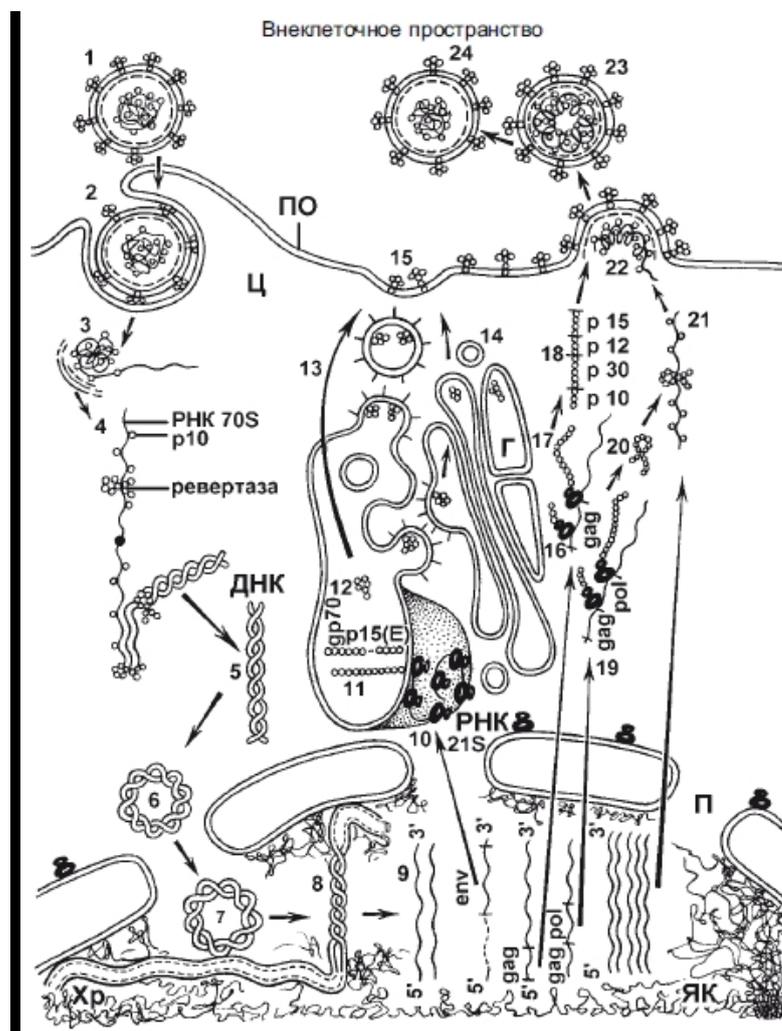


Рис. 1. Обобщенная схема основных этапов цикла развития онкогенного РНК-геномного вируса: 1 - внеклеточный онковирус; 2 - адсорбция и проникновение онковируса в клетку; 3 - внутриклеточное «раздевание» онковируса; 4 - транскриптивный комплекс; 5 - двухспиральная вирусная ДНК; 6, 7 - транспорт кольцевой ДНК онковируса в ядро клетки; 8 - интеграция ДНК-транскрипта онковируса в хромосому клетки; 9 - вирусная РНК; 10, 11 - синтез вирусных гликопротеидов (gp) на мембранах гранулярного эндо-плазматического ретикулума; 12,13- предполагаемый транспорт вирусных гликопротеидов в опушенные везикулах к поверхности клетки; 14- предполагаемый транспорт вирусных гликопротеидов через GERL-комплекс или комплекс Гольджи; 15 - локализация гликопротеидов онковируса на поверхности клетки; 16- 18 - синтез белков сердцевинки онковируса (p10, p12, p15, p30) на свободных полирибосомах; 19, 20 - синтез обратной транскриптазы онковируса на свободных полирибосомах; 21 - транспорт вирусного РНП к поверхности клетки; 22 - формирование онковируса типа А (С) в процессе почкования на поверхности клетки; 23 - внеклеточный онковирус типа А (С); 24 - внеклеточный онковирус типа С; Ц - цитоплазма; ЯК - ядро клетки; П - поры ядерной оболочки; ПО - плазматическая оболочка; Хр - хромосома клетки; Г- комплекс Гольджи; env, gag, pol - наименование генов (по Быковскому и соавт., 1983)

Первая стадия представляет собой *адсорбцию вирионов* на поверхности клетки-мишени, которая для этого должна обладать соответствующими (комплементарными) поверхностными рецепторами. Именно с ними специфически взаимодействует вирусная частица, после чего происходит их прочное связывание, по этой причине клетки восприимчивы не ко всем вирусам. Именно этим объясняется строгая определенность путей проникновения вирусов. Например, рецепторы к вирусу гриппа имеются у клеток слизистой оболочки верхних дыхательных путей, а у клеток кожи их нет. Поэтому через кожу гриппом заболеть нельзя - вирусные частицы для этого нужно вдохнуть с воздухом.

Вирусы бактерий (бактериофаги) нитевидной формы или не имеющие отростков адсорбируются не на клеточной стенке, а на фимбриях. Вначале вирионы адсорбируются посредством электростатического взаимодействия или за счет ван-дер-ваальсовых сил (поэтому вирусы осаждаются не только на поверхности клеток, но и на любой поверхности вообще). Первая фаза адсорбции обратима - вирусную частицу можно отделить от клетки-мишени (например, обычным встряхиванием), после чего следует необратимая фаза, при которой разделение уже невозможно.

Вторая стадия состоит в *проникновении* целого вириона или его нуклеиновой кислоты внутрь клетки-хозяина. Легче происходит проникновение вирусов в животные клетки, поскольку те не имеют оболочек и вирусы попадают в них путем обычного эндоцитоза (если говорят о проникновении именно вируса, употребляют научное название этого процесса - *виropексис*, предложенное **Ф. де Сент-Гроотом** в 1948 г.) (рис. 2). Если вирион имеет наружную липопротеидную мембрану, то при контакте с клеткой-хозяином мембраны сливаются и вирион оказывается в цитоплазме (рис. 3). Значительно сложнее вирусам растений, грибов и бактерий, вынужденным «пробиваться» через жесткую клеточную стенку. Для этого имеются конкретные приспособления. В частности, бактериофаги обладают ферментом типа лизоцима, благодаря которому они растворяют стенку бактериальной клетки.

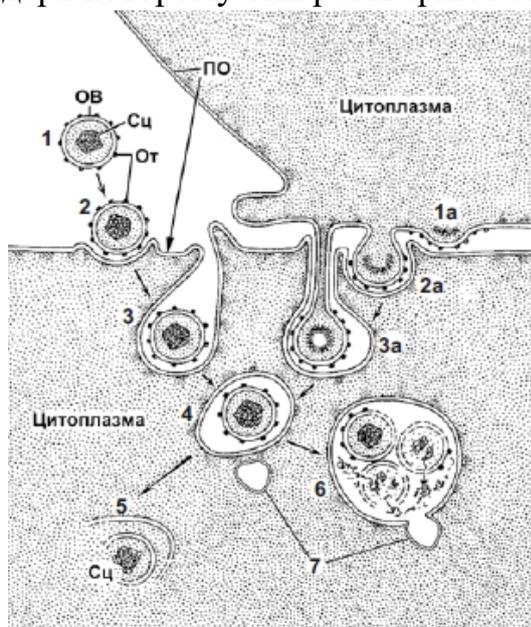


Рис. 2. Проникновение онковирусов в клетку в процессе виropексиса (схема): 1 - внеклеточный онковир типа С; 2 - адсорбция вируса на свободной клеточной поверхности; 3 - микропиноцитоз (рофеоцитоз) вируса: 1а, 2а, 3а - последовательные этапы проникновения онковирусов типа А, почкующихся на поверхности соседней клетки; 4 - локализация вируса в фагосоме; 5 - проникновение сердцевины вируса в цитоплазму; 6 - репликация вируса; 7 - выход нового вируса.

цитоплазму; 6 - деструкция онковируса в фаголизосоме; 7 - лизосомы; ПО - плазматическая оболочка клетки; ОВ - оболочка вируса; Сц - сердцевина; От - отростки оболочки вируса (по Быковскому и совет., с изменениями и дополнениями)

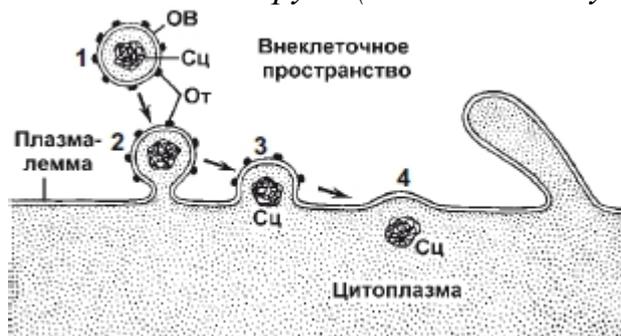


Рис. 3. Проникновение онковируса в клетку в процессе слияния оболочки вируса и плазматической оболочки клетки (схема): 1 - внеклеточный онковирус типа С; 2,3,4- последовательные этапы слияния оболочки вируса и клетки; ОВ - оболочка вируса; От - отростки оболочки вируса; Сц - сердцевина (по Быковскому и соавт., 1983)

Третья стадия называется **депротеинизация**. В ходе ее происходит освобождение носителя генетической информации вируса - его нуклеиновой кислоты. У многих вирусов, например бактериофагов (за исключением нитчатых), этот процесс совпадает с предыдущей стадией, поскольку в клетку проникает только нуклеиновая кислота, а белковая оболочка остается за пределами клетки-хозяина. Если вирус проникает в клетку целиком, то удаление оболочки осуществляется клеточными протеазами. Напомним, что вирион может проникать в клетку в результате эндоцитоза. Как и положено, при этом формируется вакуоль-фагосома, с которой сливаются первичные лизосомы. Однако в случае обычного фаго- или пиноцитоза ферменты лизосом расщепляют органические вещества фагосомы до мономеров, которые впоследствии используются клеткой для своих нужд. По невыясненным до конца причинам с проникшими в клетку вирионами этого не происходит в полной мере. Ферментативному расщеплению подвергается лишь белковая составляющая вирусной частицы, а его нуклеиновая кислота остается неповрежденной. В результате нуклеиновая кислота вируса освобождается, и впоследствии именно она существенным образом преобразует деятельность клетки-хозяина, подчиняя ее метаболизм своим потребностям и вынуждая ее синтезировать определенные вещества. Обращаем внимание на то, что сам вирус не обладает необходимыми для этого механизмами ферментами, поэтому для синтеза нужных молекул он использует клеточные ферменты (например, протеазы, РНК-полимеразы и др.) и структуры (например, рибосомы). Пути реализации генетической информации разными вирусами называют стратегией вирусного генома.

В ходе четвертой стадии на основе вирусной нуклеиновой кислоты происходит **синтез необходимых для вируса соединений**. Вначале образуется «ранняя» мРНК, которая будет служить матрицей для «ранних» вирусных белков. У вирусов ранними молекулами считаются те, что появились до репликации вирусной нуклеиновой кислоты. Именно они будут направлять последующий синтез нуклеиновой кислоты вируса. Молекулы, которые образовались после репликации нуклеиновой кислоты, называются поздними. Однако необходимо отметить, что направление синтеза вирусных молекул в клетке зависит от типа нуклеиновой кислоты вируса. У ДНК-содержащих вирусов общая схема биосинтеза не имеет принципиальных особенностей и включает в себя обычные этапы: ДНК -> мРНК -> белок. Мелкие вирусы для этого

проникают в ядро и в процессе транскрипции используют РНК-полимеразы клетки (обычные, т.е. ДНК-зависимую РНК-полимеразу). Крупные (например, вирус оспы) вирусы осуществляют свой синтез не в ядре, а в цитоплазме. Поэтому они не могут задействовать клеточные ферменты, и транскрипцию у них направляет собственная (вирионная) РНК-полимераза.

РНК-содержащие вирусы по этому признаку делятся на несколько групп. Наиболее просто все устроено у представителей первой группы (пикорна-, тога- и коронавирусы). У них транскрипция не происходит, потому что вирионная однонитчатая РНК сама выполняет функцию мРНК, т.е. служит матрицей для синтеза вирионного белка на рибосомах клетки. Следовательно, схема биосинтеза у них следующая: *мРНК* -> *белок*. Такие вирусы называются плюс-нитевые (или вирусы с позитивным геномом).

Вторую группу составляют минус-нитевые вирусы (или вирусы с негативным геномом - вирусы гриппа, кори, паротита и др.). Они также содержат однонитчатую РНК, однако она не информативна для прямой трансляции, поэтому у них сначала происходит транскрипция на вирионной РНК комплементарной ей м-РНК, которая и будет служить матрицей для последующего синтеза вирус-ных белков. Следует отметить, что транскрипция управляется ферментом РНК-зависимой РНК-полимеразой. Этот фермент отсутствует в клетке (понятно, что клетке он просто не нужен, поскольку в ней никогда не синтезируется РНК на РНК) и приносится самим вирионом. В этом случае схема биосинтеза будет: *-РНК* -> *мРНК* -> *белок*.

У составляющих третью группу ретровирусов (они относятся к онковирусам) биосинтез идет наиболее сложно. У них на исходной однонитчатой РНК-матрице сначала синтезируется ДНК - уникальный случай в природе, которому нет аналогов. Этот процесс управляется особым ферментом - РНК-зависимой ДНК-полимеразой (его еще называют обратной транскриптазой, или ревертазой). Полученная молекула ДНК впоследствии приобретает кольцевую форму и называется ДНК-провирус. Затем эта молекула встраивается в хромосому клетки-хозяина и с помощью клеточной же РНК-полимеразы многократно транскрибируется. Образовавшиеся копии выполняют следующие функции: во-первых, являются мРНК, по которой на клеточных рибосомах синтезируются белки капсида вируса, во-вторых, они сами непосредственно являются РНК вириона. Таким образом, схема биосинтеза у этих вирусов: *РНК* -> *ДНК* -> *мРНК* -> *белок*.

Четвертую группу образуют вирусы, содержащие двухнитчатую РНК. У них транскрипция также осуществляется с помощью вирусного фермента РНК-зависимой РНК-полимеразы.

В пятой стадии происходит синтез компонентов вирусной частицы - нуклеиновой кислоты и белков капсида, причем все компоненты синтезируются многократно.

В ходе шестой стадии из синтезированных ранее многочисленных копий нуклеиновой кислоты и белков формируются новые вирионы путем самосборки. Для этого необходимо, чтобы концентрация компонентов вириона достигла высокого (критического) уровня. Обращаем внимание на то обстоятельство, что компоненты вирусной частицы синтезируются отдельно и в разных частях клетки. У сложных вирусов, кроме капсида, также образуется наружная оболочка из компонентов плазматической мембраны клетки.

Последняя - **седьмая стадия** - представляет собой выход вновь собранных вирусных частиц из клетки-хозяина. У разных вирусов этот процесс проходит неодинаково. У некоторых вирусов это сопровождается гибелью клетки за счет освобождения литических ферментов лизосом - лизис клетки. У других вирионы выходят из живой клетки путем отпочковывания (см. рис. 1), однако и в этом случае клетка со временем погибнет, поскольку при отпочковывании повреждается плазматическая мембрана.

Время, прошедшее с момента проникновения вируса в клетку до выхода новых вирионов, называется скрытым, или латентным, периодом. Оно может широко варьировать: от нескольких часов (пяти-шести у вирусов оспы и гриппа) до нескольких суток (вирусы кори, аденовирусы и др.).

У некоторых бактериофагов наряду с вирулентными (быстро развивающиеся вирусы) имеются умеренные фаги. Их нуклеиновая кислота после проникновения в бактериальную клетку интегрируется в ДНК клетки и становится профагом. Профаг не оказывает литического воздействия на клетку-хозяина и при делении реплицируется вместе с клеточной ДНК. Бактерии, содержащие профаг, называются лизогенными. Они проявляют устойчивость к содержащемуся в них фагу, а также к близким к нему другим фагам. Связь профага с бактерией весьма прочная, но она может быть нарушена под воздействием индуцирующих факторов (ультрафиолетовые лучи и ионизирующая радиация, химические мутагены). Следует отметить, что лизогенные бактерии могут менять свойства (например, выделять новые токсины).

Взаимодействие вирусов с клеткой хозяина (Репродукция вирусов)

Взаимодействие идет в единой биологической системе на генетическом уровне.

I. Продуктивный тип взаимодействия вируса с клеткой, то есть репродукция вируса (лат. re - повторение, productio - производство), проходит в 6 стадий:

- 1) адсорбция вирионов на клетке;
- 2) проникновение вируса в клетку путем эндоцитоза (виропексиса) или в результате слияния вирусной и клеточной мембран;
- 3) «раздевания» и высвобождение вирусного генома (депротеинизация вируса)
- 4) синтез вирусных компонентов. С помощью специальных ферментов (полимераз) снимаются копии с родительской нуклеиновой кислоты (происходит репликация), а также синтезируются информационные РНК, которые соединяются с рибосомами и осуществляют синтез дочерних вирусных белков (трансляцию);
- 5) формирование вирионов;
- 6) выход вирионов из клетки. Простые вирусы, лишенные суперкапсида, вызывают деструкцию клетки и попадают в межклеточное пространство. Другие вирусы, имеющие липопротеидную оболочку, выходят из клетки путем почкования. При этом клетка длительное время сохраняет жизнеспособность. В отдельных случаях вирусы накапливаются в цитоплазме или ядре зараженных клеток, образуя кристаллоподобные скопления – тельца включений.

II. Абортивный тип взаимодействия вирусов с клеткой. Этот тип взаимодействия не заканчивается образованием вирусного потомства и может возникать при следующих обстоятельствах:

- 1) заражение чувствительных клеток дефектными вирусами или дефектными вирионами;

- 2) заражение стандартным вирусом генетически резистентных к нему клеток;
- 3) заражение стандартным вирусом чувствительных клеток в не перmissive условиях (не позволяют) условиях.

Различают **дефектные вирусы, дефектные вирионы и псевдовирионы**.

Дефектные вирусы существуют как самостоятельные виды, которые продуцируются только при наличии вируса-помощника (например, вирус гепатита D размножается только в присутствии вируса гепатита B). Дефектные вирионы обычно лишены части генетического материала и могут накапливаться в популяции многих вирусов при множественном заражении клеток. **Псевдовирионы** - это вирусы, в капсид которых помещена нуклеиновая кислота клетки хозяина, а не вирусная нуклеиновая кислота.

III. Интеграционный тип взаимодействия вирусов с клеткой (виrogenия). Это взаимное сосуществование вируса и клетки в результате интеграции нуклеиновой кислоты вируса в хромосому клетки хозяина. При этом интегрированный геном вируса реплицируется и функционирует как составная часть генома клетки.

Рекомендации по оформлению протокола Классификация культур тканей и клеток, применяемых в вирусологии

1. Тканевые или органные культуры			
Ткани зародышевого органа или его части, которые поддерживаются in vitro и сохраняют дифференциацию клеток и их функции			
2. Клеточные культуры			
Характеристики	Первично-трипсинизированные культуры клеток	Перевиваемые культуры клеток	Диплоидные культуры клеток
Морфология клеток по сравнению с исходной тканью	Не отличается	Отличается	Отличается
Набор хромосом	Диплоидный	Гетероплоидный	Диплоидный
Продолжительность жизни	Ограничена 1-3 пассажами	Не ограничена количеством пассажей	Ограничена 20-100 пассажами
Рост в суспензии	Невозможен	Возможен	Невозможен
Признаки малигнизации	Отсутствуют	Всегда есть	Отсутствуют
Период генерации	3-7 дней	2/3-1 день	1-15 дней
Контактная ингибиция при выращивании на стекле	Есть	Отсутствует	Есть

Примеры	1. Культура клеток почек обезьян 2. Культура клеток фибробластов эмбриона человека 3. Культура клеток фибробластов куриного эмбриона	1. HeLa (из карциномы шейки матки) 2. KB (из карциномы ротовой полости человека) 3. HEp-2 (карцинома гортани человека) 4. Vero (из почки зеленой обезьяны)	Линии клеток фибробластов эмбриона человека (WI - 38, MRC - 5, MRC - 9, IMR - 90), коров, свиней, овец
---------	--	---	--

Классификация питательных сред для культур клеток

Естественные	Ферментативные гидролизаты	Синтетические
Среда Эндерса: 85-90% коровьей амниотической жидкости; 5-10% коровьего эмбрионного экстракта, 5% конской сыворотки	Аминопептид Гемогидролизат Гидролизат лактальбумина	Сбалансированные солевые растворы: Эрла, Хэнкса, Дульбекко и Фогта 2. Поддерживающие среды: 199, Игла, ДМЕМ (среда Игла, модифицированная Дульбекко), МЕМ (среда Мельника-Игла)

Среды для культур клеток, применяемые в вирусологии, делят на 2 основных категории, - ростовые среды и среды поддержки.

Ростовые среды (РС), благодаря высокому содержанию сыворотки, способствуют быстрому клеточному росту. После формирования монослоя и перед инокуляцией вируса ростовую среду удаляют и заменяют средой поддержки. Для приготовления ростовой среды к питательной среде (например, ДМЕМ), добавляют 5-10% сыворотки крупного рогатого скота (КРС) или эмбрионной телячьей сыворотки (ЕТС) и антибиотики (пенициллин и стрептомицин).

Среды поддержки с низким содержанием сыворотки позволяют сохранить культуры клеток в состоянии медленного стойкого метаболизма в период размножения вируса.

Задание №1. На демонстрационных препаратах ознакомиться с разными видами культур клеток, которые используются в вирусологии, зарисовать в протокол.

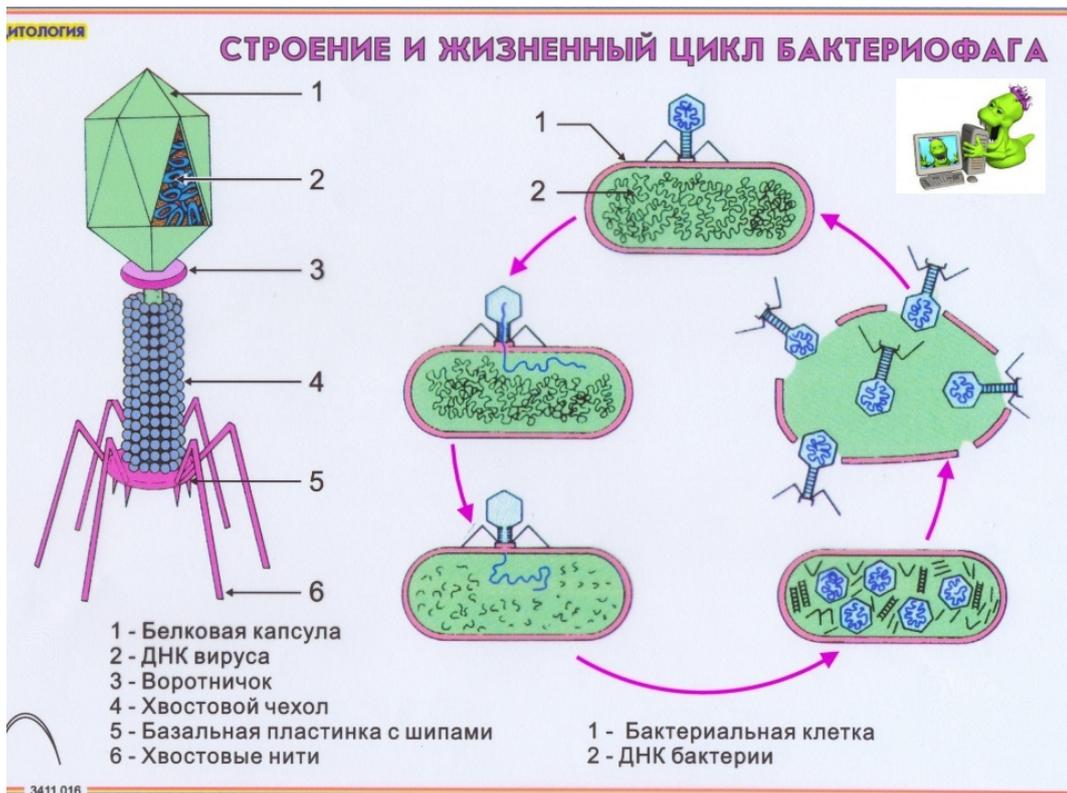
Задание №2. Ознакомиться и записать в протокол методику подготовки материала для вирусологических исследований.

Задание №3. Осуществить инфицирование культур клеток вирусосодержащим материалом.

Вопросы для самоконтроля

- Какие признаки положены в основу современной классификации вирусов?

- Свойством всего живого является способность к самовоспроизведению. Для вирусов существует один тип размножения. Как он называется? В чем его суть?
- Какие особенности репродукции РНК- и ДНК-геномных вирусов? В чем заключается роль обратной транскриптазы при репродукции ретровирусов?
- Вирусы являются достаточно устойчивыми в окружающей среде, к действию стерилизующих и дезинфицирующих факторов и средств. Какие особенности структуры вирусов обеспечивают их стойкость и способствуют развитию вирусных эпидемий и пандемий?
- Первичной моделью для культивирования вирусов были лабораторные животные. Назовите их, укажите преимущества и ограничения их использования.
- Вирусы относительно просто можно получить в большом количестве одним из методов культивирования. О какой системе культивирования вирусов идет речь? Почему ее нельзя считать универсальной?
- Вирусы являются особыми паразитами клеток человека, животных и растений. Как эта особенность вирусов была использована для культивирования вирусов *in vitro*?
- Как отличается действие умеренных и вирулентных бактериофагов? Каково их практическое использование?



Вирусы бактерий (бактериофаги).

Естественной средой обитания фагов является бактериальная клетка, поэтому фаги распространены повсеместно (например, в сточных водах). Фагам присущи биологические особенности, свойственные и другим вирусам.

Наиболее морфологически распространенный тип фагов характеризуется наличием головки- икосаэдра, отростка (хвоста) со спиральной симметрией (часто имеет полый стержень и сократительный чехол), шипов и отростков (нитей), т.е. внешне несколько напоминают сперматозоид.

Взаимодействие фагов с клеткой (бактерией) строго специфично, т.е. бактериофаги способны инфицировать только определенные виды и *фаготипы* бактерий.

Основные этапы взаимодействия фагов и бактерий.

1. Адсорбция (взаимодействие специфических рецепторов).
2. Внедрение вирусной ДНК (инъекция фага) осуществляется за счет лизирования веществами типа лизоцима участка клеточной стенки, сокращения чехла, вталкивания стержня хвоста через цитоплазматическую мембрану в клетку, впрыскивание ДНК в цитоплазму.
3. Репродукция фага.
4. Выход дочерних популяций.

Основные свойства фагов.

Различают *вирулентные фаги*, способные вызвать продуктивную форму процесса, и *умеренные фаги*, вызывающие редуцированную фаговую инфекцию (редукцию фага). В последнем случае геном фага в клетке не реплицируется, а внедряется (интегрируется) в хромосому клетки хозяина (ДНК в ДНК), фаг превращается в *профаг*. Этот процесс получил название *лизогении*. Если в результате внедрения фага в хромосому бактериальной клетки она приобретает новые наследуемые признаки, такую форму изменчивости бактерий называют *лизогенной (фаговой) конверсией*. Бактериальную клетку, несущую в своем геноме профаг, называют лизогенной, поскольку профаг при нарушении синтеза особого белка-репрессора может перейти в литический цикл развития, вызвать продуктивную инфекцию с лизисом бактерии.

Умеренные фаги имеют важное значение в обмене генетическим материалом между бактериями - в *трансдукции* (одна из форм генетического обмена). Например, способностью вырабатывать экзотоксин обладают только возбудитель дифтерии, в хромосому которого интегрирован умеренный профаг, несущий *оперон tox*, отвечающий за синтез дифтерийного экзотоксина. *Умеренный фаг tox вызывает лизогенную конверсию нетоксигенной дифтерийной палочки в токсигенную.*

По спектру действия на бактерии фаги разделяют на :

- поливалентные (лизируют близкородственные бактерии, например сальмонеллы);
- моновалентные (лизируют бактерии одного вида);
- типоспецифические (лизируют только определенные фаговары возбудителя).

На плотных средах фаги обнаруживают чаще с помощью спот (spot) - теста (образование негативного пятна при росте колоний) или методом агаровых слоев (титрования по Грациа).

Практическое использование бактериофагов.

1. Для идентификации (определение фаготипа).
2. Для фагопрофилактики (купирование вспышек).
3. Для фаготерапии (лечение дисбактериозов).
4. Для оценки санитарного состояния окружающей среды и эпидемиологического анализа.

Тема: Индикация вирусной репродукции

Актуальность темы:

Диагностика вирусных инфекций в большинстве случаев базируется на выделении вируса из инфекционного материала и его дальнейшей идентификации. Правильное взятие материала для исследования, своевременная доставка его в лабораторию с соблюдением условий для сохранения возбудителя, верный выбор методов культивирования и идентификации вирусов позволяет своевременно установить диагноз вирусного заболевания.

Целью данного занятия является научиться определять вирусную репродукцию. Для достижения этой цели необходимо уметь:

выявлять вирусы в различных чувствительных системах (клеточных культурах, куриных эмбрионах, чувствительных лабораторных животных);

различать различные виды ЦПД в культуре клеток;

знать методику постановки реакций бляшкообразования под агаровым и бентонитовым покрытием;

проводить учет "цветной пробы", поставленной с целью индикации вирусов в культуре клеток, учет реакции гемадсорбции и реакции гемагглютинации.

На практическом занятии студенты могут ознакомиться с различными методами индикации вирусов, учатся интерпретировать полученные результаты.

Конкретные цели:

1. Трактовать морфологию и ультраструктуру вирусов.
2. Анализировать особенности взаимодействия вирусов с живыми системами.
3. Оценивать результаты размножения вирусов в живых системах.
4. Изучить методы культивирования вирусов в лабораторных условиях.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Цитопатическое действие вируса (ЦПД)	ЦПД - видимые под микроскопом морфологические изменения клеток, возникающие в результате внутриклеточной репродукции вирусов.
Включения	Включения - скопления вирионов или отдельных их компонентов в цитоплазме или ядре клеток, выявляемые под микроскопом специальными методами окраски. Вирус натуральной оспы образует цитоплазматические включения - тельца Гварниери. Вирусы герпеса и аденовирусы образуют внутриядерные включения.
Бляшки	Бляшки – ограниченные участки разрушенных вирусами клеток, культивируемых на питательной среде под агаровым или бентонитовым покрытием, которые выглядят как светлые пятна на фоне окрашенных живых клеток. Одна бляшка – это клетки, разрушенные потомством одного вируса.
Реакция гемагглютинации	Реакция гемагглютинации (РГА) основана на способности некоторых вирусов вызывать агглютинацию (склеивание) эритроцитов за счет вирусных гликопротеиновых шипов - гемагглютининов.
Реакция	Реакция гемадсорбции - способность культур клеток,

гемадсорбции	инфицированных гемагглютинирующими вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты.
Цветная проба	Цветная проба оценивается по изменению цвета индикатора в питательной среде клеток. Если вирусы не размножаются в культуре клеток, живые клетки в процессе метаболизма выделяют кислые продукты, что приводит к изменению рН среды, а соответственно и цвета индикатора. При репродукции вируса нормальный метаболизм клеток нарушается, в результате чего клетки погибают, а среда сохраняет свой первоначальный цвет.

Теоретические вопросы к занятию:

- Методы изучения вирусов, их оценка.
- Особенности взятия, обработки и транспортировки материала для вирусологических исследований.
 - Методика подготовки вирусосодержащего материала и техника инфицирования чувствительных к вирусам систем.
 - Методы культивирования вирусов, их оценка.
 - Реакции вирусной гемагглютинации и гемадсорбции. Механизм, практическое значение, использование, диагностическая ценность.
 - Цитопатическое действие вирусов (ЦПД). Классификация ЦПД вирусов.

Практические задания, выполняемые на занятии:

1. Поставить реакцию гемагглютинации (РГА) с целью выявления вируса в аллантоисной жидкости куриного эмбриона, определить титр вируса.
2. Выявить вирусную репродукцию в клеточных культурах по цитопатогенному действию (ЦПД), бляшкообразованию, "цветной" пробе, реакции гемадсорбции.
3. Изучить различные виды ЦПД вирусов.

Содержание темы:

На практическом занятии студенты:

знакомятся с методами выявления вирусов в различных чувствительных системах (клеточных культурах, куриных эмбрионах, чувствительных лабораторных животных);

учатся выявлять вирус в культуре клеток по цитопатогенному действию;

изучают различные виды ЦПД в культуре клеток; знакомятся с методикой постановки реакций бляшкообразования под агаровым и бентонитовым покрытием;

изучают вирусные бляшки в культуре клеток под агаровым и бентонитовым покрытием;

осуществляют учет "цветной пробы", поставленной с целью индикации вирусов в культуре клеток;

осуществляют учет реакции гемадсорбции, поставленной с целью индикации вирусов в культуре клеток;

осуществляют учет реакции гемагглютинации, поставленной с целью индикации вирусов в хорион-аллантоисной жидкости куриного эмбриона.

Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Рекомендации по оформлению протокола.

Культивирование вирусов.

Культивировать вирусы можно только на биологических моделях: в организме лабораторных животных, в куриных эмбрионах развивающихся и культурах клеток.

Методы культивирования и индикации вирусов:

1. Культивирование вирусов в организме лабораторных животных.
2. Культивирование вирусов в куриных эмбрионах.
3. Культивирование вирусов в тканевых культурах.

Клеточная культура - система клеток, получаемых из ткани, представляет собой слой клеток, прикрепленных к стеклу, или в виде суспензии. Наиболее практическое применение получили однослойные культуры первично-трипсинизированных клеток и линий перевиваемых клеток. Суть методов при приготовлении первичных культур тканей заключается в разрушении межклеточного ткани и разъединение клеток для дальнейшего получения монослоя. Разъединение клеток проводится путем воздействия на ткань протеолитических ферментов (трипсина). Для культивирования культуры клеток применяют синтетические питательные среды - 199, Игла, Хэнкса, Эрла (эти среды имеют аминокислоты, витамины, глюкозу, минеральные соли). Смена питательной среды проводится через 2-3 дня.

1. Первичные (трипсинизированные) культуры клеток – это клетки, в которых межклеточные связи разрушают ферментами (трипсином, панкреатин) и получают монослой клеток на стекле.

2. Перевиваемые (стабильные):

а) нормальные (ПКБ - почки барана; СМЦ - сердце обезьяны циномоглус)

б) опухолевые - Нела - рак шейки матки; Нер - 1 - **эпидермоидный рак гортани** Дейтройт 6 - костный мозг больного раком легкого. О наличии вируса в зараженной культуре клеток можно судить по **цитопатическим действиям (ЦПД)** - патологическим изменениям морфологии клеток, вплоть до их гибели, возникающих в результате репродукции вирусов, и наблюдаются под микроскопом:

1. *Дегенерация клеток* (округление, изменение формы, разрушение);

2. *Появление включений* (Гварниери - вирус натуральной оспы и телец Бабеша-Негри - вирус бешенства)

3. Разрушение слоя клеток (парамиксовирусы)

4. Образование гигантских многоядерных клеток - симпластов (вирус кори).

5. Образование «негативных колоний», или «бляшкообразование» - ограниченные участки разрушенных вирусами клеток в сплошном монослое культуры клеток.

Они видны невооруженным глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток. Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою после выхода их из разрушенной клетки и обеспечивает взаимодействие вирусов только с соседними клетками. Каждая «бляшка» образуется потомством одного вириона.

Методы индикации вирусов

1. Выявление цитопатогенного действия вирусов (ЦПД) в культуре клеток.

ЦПД - это дегенеративные изменения в клетках, которые проявляются в результате репродукции в них вирусов

Тип ЦПД		Вирусы, вызывающие ЦПД
Полная дегенерация		Полиовирус Вирусы Коксаки Вирусы ЕСНО
Частичная дегенерация	По типу гроздьобразования	Аденовирусы
	По типу очаговой деструкции	Вирус оспы Вирус гриппа
	По типу симпластообразования	Вирус кори Вирус паротита Вирус парагриппа РС-вирус Вирус герпеса
Пролиферация		Онкогенные вирусы

2. Появление внутриядерных включений, выявляемых при окраске по Романовскому-Гимзе, при люминесцентной и электронной микроскопии.

3. Бляшкообразование под бентонитовым покрытием.



4. Реакция гемагглютинации (РГА).

5. Реакция гемадсорбции.

6. Цветная проба. В результате жизнедеятельности клеток в питательной среде накапливаются кислые продукты, которые приводят к соответствующему изменению рН среды (желтый). При заражении культуры клеток цитопатогенными вирусами подавляется метаболизм клеток и рН среды не изменяется (среда остается красной).

7. Выявление размножения вирусов в куриных эмбрионах.

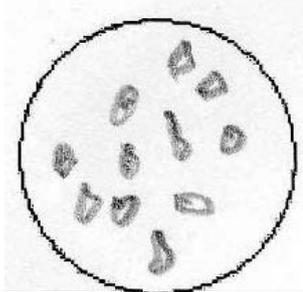
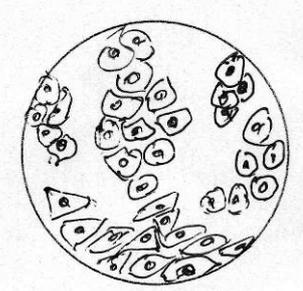
Часть эмбриона	Вирусы	Признак размножения
Желточный мешок	Вирус простого герпеса	Гибель зародыша
Хорион	Вирус простого герпеса Поксвирусы Вирус саркомы Рауса	Бляшки
Аллантоис	Вирус гриппа	Задержка развития зародыша и капилляротоксикоз. Гемагглютинация

	Вирус паротита	Гибель зародыша
Амнион	Вирус гриппа	Гемагглютинация
	Вирус паротита	Гибель зародыша

Задание 1. Научиться выявлять вирусную репродукцию в культурах клеток по цитопатогенному действию.

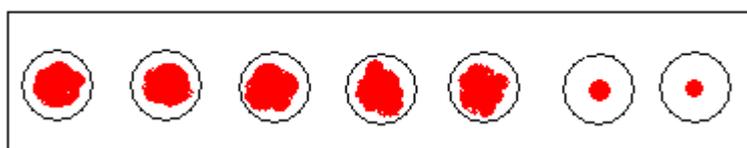
Студенты оценивают монослой культуры клеток, инфицированной на предыдущем занятии, выявляют цитопатогенное действие, анализируют его и зарисовывают в протоколах.

Задание 2. Изучить различные виды ЦПД вирусов на демонстрационных препаратах

Тип ЦПД	Вирусы, вызывающие ЦПД	Вид ЦПД
Полная дегенерация	Вирусы полиомиелита, вирусы Коксаки, вирусы ЕСНО	
По типу гроздеобразования	Аденовирусы	
По типу симпластообразования	Вирус кори, вирус паротита, вирус парагриппа, РС - вирус, вирус герпеса	

Задание 3. Осуществить учет реакции гемагглютинации с целью выявления вирусов гриппа в хорион-аллантоисной жидкости.

РГА - это склеивание эритроцитов под действием вирусов.



1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 КЭ
Разведения вирусосодержащей жидкости.

Вопросы для самоконтроля.

- После инфицирования клеточных культур с последующим инкубированием пробирок в термостате наблюдается помутнение среды поддержки. О чем это свидетельствует?
- Какие биологические признаки характерны для репродукции вируса в курином эмбрионе?
- Как и когда можно использовать реакцию гемагглютинации (РГА) для индикации вирусов?
- Каковы признаки репродукции вируса при культивировании вируса в лабораторных животных?
- Культивируя вирус кори в культуре клеток, можно выявить большие многоядерные клетки. Как можно назвать такие изменения в пораженных клетках? Какие еще типы ЦПД могут вызывать вирусы в культуре клеток?
- Могут ли размножаться вирусы в культуре клеток без появления ЦПД? Если да, то каким образом можно выявить репродукцию таких вирусов?

Практическое занятие №14

Тема: Противовирусный иммунитет. Иммунные реакции в вирусологии: реакция гемагглютинации, гемадсорбции, реакция торможения гемагглютинации, реакция нейтрализации. Иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммунный анализ (РИА), иммунный блоттинг (ИБ), прямая и косвенная иммунофлюоресценция (РИФ), иммунохроматографический анализ (ИХА). Иммунология опухолей.

Актуальность темы.

Серологическая идентификация вирусных антигенов с помощью стандартных диагностических сывороток и серологическая диагностика вирусных заболеваний на основе выявления антител в исследуемых сыворотках с помощью стандартных антигенов - диагностикумов являются основными направлениями исследований в практических вирусологических и иммунологических лабораториях. Поэтому знание и понимание сути серологических исследований, принципов и особенностей постановки серологических реакций является залогом эффективности лабораторной диагностики вирусных заболеваний и, соответственно, эффективности их лечения. Все это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

Конкретные цели:

- Усвоить закономерности иммунитета при вирусных инфекциях.
- Овладеть основными методами постановки серологических реакций, которые используются в вирусологии.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.

Термин	Определение
Комплемент	Сложный комплекс белков сыворотки крови, который при активации комплексом антиген-антитело и другими факторами высвобождает мембраноатакующие ферменты и обеспечивает неспецифическую защиту организма от чужеродных агентов клеточной природы.
Диагностические сыворотки	Препараты, полученные из крови иммунизированных животных (кроликов, баранов, лошадей и др.), имеющих высокий уровень специфических антител.
Моноклональные антитела	Препараты антител, высокоспецифических к одной антигенной детерминанте, полученные из одного клона клеток-продуцентов <i>in vitro</i> .
Диагностикумы	Диагностические препараты из антигенов.
Гемолитическая сыворотка	Сыворотка крови, содержащая антитела-гемолизины. Получают путем 3-4 разовой внутривенной иммунизации кролика 50% суспензией эритроцитов барана и др. с последующей инактивацией комплемента при температуре 56°C.

Теоретические вопросы к занятию:

- Особенности серологических реакций, используемых в вирусологии.
- Методика парных сывороток.
- Особенности вирусных диагностикумов.
- Реакция связывания комплемента и особенности ее применения в вирусологии.
- Реакции, которые используются исключительно в вирусологии, - реакции торможения гемагглютинации и гемадсорбции, реакция вируснейтрализации.

Практические задания, выполняемые на занятии:

1. Осуществить постановку реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с целью серологической диагностики вирусной инфекции, сделать учет реакции и выводы.
2. Изучить схему постановки и сделать учет реакции вируснейтрализации (РН) с целью серологической идентификации вируса.
3. Изучить схему постановки и сделать учет реакции связывания комплемента (РСК) с целью серологической диагностики вирусного заболевания. Обосновать вывод.
4. Осуществить учет реакции непрямой гемагглютинации поставленной с целью серологической диагностики вирусной инфекции.

Содержание темы.

На практическом занятии студенты изучают закономерности иммунитета при вирусных инфекциях, роль гуморальных и клеточных механизмов, которые

принимают участие в формировании иммунитета и антигенное строение вирусов. Знакомятся с методикой постановки и принципами учета серологических реакций, которые используются в вирусологии: реакции гемагглютинации, реакции торможения гемагглютинации, реакции связывания комплемента, реакции нейтрализации. Проводят учет реакций торможения гемагглютинации, поставленных с целью серологической идентификации и диагностики вирусных инфекций. Осуществляют учет реакции связывания комплемента (с целью выявления противовирусных антител), оценивают реакцию вируснейтрализации (с целью идентификации вирусов). Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Противовирусный иммунитет.

Особенности вирусов как облигатных внутриклеточных паразитов определяют характер иммунитета при вирусных инфекциях. Кроме того, вирусы обладают уникальными свойствами: 1. могут инфицировать ткани, не вызывая воспалительных реакций; 2. могут реплицироваться в клетках на протяжении всей жизни не повреждая их; 3. иногда нарушают некоторые специализированные функции клетки, не вызывая явных нарушений функций целостного органа; 4. иногда вызывают повреждение ткани, а затем полностью исчезают из организма.

Чтобы ограничить диссеминацию любого вируса и предотвратить реинфекцию, иммунный ответ должен:

1. Быть способным остановить проникновение вирионов в клетки;
2. Уничтожить уже инфицированные клетки, чтобы снизить распространение вируса.

Таким образом, на вирус развиваются иммунологические реакции двух типов:

- 1) направленные против вириона (преимущественно гуморальные реакции);
- 2) действующие на клетку, инфицированную вирусом (преимущественно клеточные).

Вирусы проникают во внутреннюю среду организма через слизистые оболочки (чаще всего) или прямым проникновением в кровоток – через поврежденную кожу, например, при укусе насекомого или уколе инъекционной иглой. Размножение вирусов обычно происходит в эпителиальных клетках, а вслед за этим в некоторых случаях они проникают в кровоток (виремия), что приводит к диссеминации и инфицированию других тканей. Выздоровление обычно означает полное устранение вируса из организма, но некоторые вирусы (напр., вирус герпеса) способны персистировать (оставаться) в организме в скрытой (латентной, неинфекционной) форме после затухания острой инфекции и в какой-то момент реактивироваться с образованием новых вирусных частиц. Другие вирусы (напр., вирус гепатита В) персистируют в инфекционной форме, несмотря на иммунный ответ хозяина.

Первый защитный барьер при вирусной инфекции – это препятствующие внедрению вирусов кожные покровы и слизистые оболочки (механические барьеры). В случае нарушения их целостности вступают механизмы экстренной неспецифической защиты - врожденный иммунитет – интерфероны, НК-клетки (нормальные киллеры) и макрофаги.

Интерфероны (ИФ) – это семейство гликопептидов, которые подразделяются на:

α -интерфероны (α -ИФ) – лейкоцитарный ИФ - семейство включает около 20 белков, продуцируются в основном лейкоцитами и макрофагами;

β - интерфероны (β -ИФ) – фибробластный – известно $\beta 1$ и $\beta 2$ -ИФ, продуцируются в основном фибробластами;

γ - интерфероны – продуцируются активированными Т-хелперами 1-го типа и ЕК-клетками.

Связывание ИФ с рецепторами инфицированной вирусом клетки индуцирует три одновременно протекающих процесса, которые заканчиваются:

- 1) активацией эндорибонуклеазы, приводящей к разрушению вирусной РНК;
- 2) подавлением синтеза вирусной мРНК;
- 3) подавление синтеза белков вирусной оболочки.

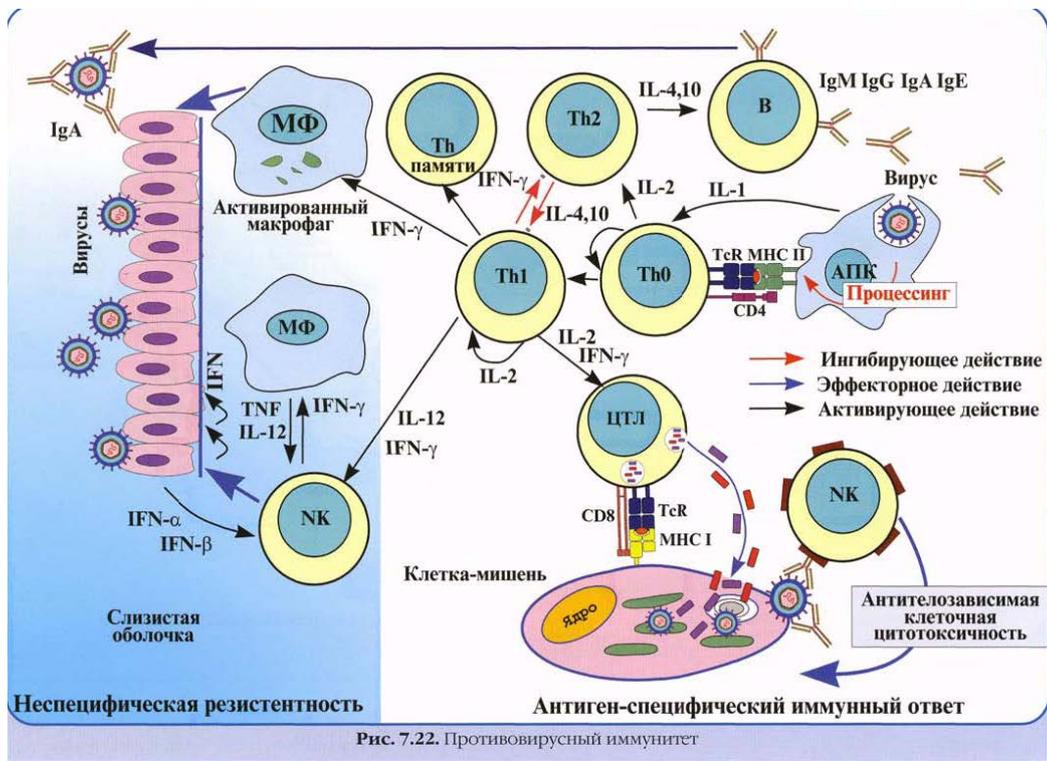
Специфический иммунный ответ при вирусных инфекциях.

Специфические антитела против вирусных антигенов могут нейтрализовать внеклеточные формы – вирионы, препятствуя их взаимодействию с клетками организма. Против внутриклеточных форм – вирусов – антитела неэффективны.

Местный специфический противовирусный иммунитет в месте входных ворот инфекции обеспечивается секреторным IgA.

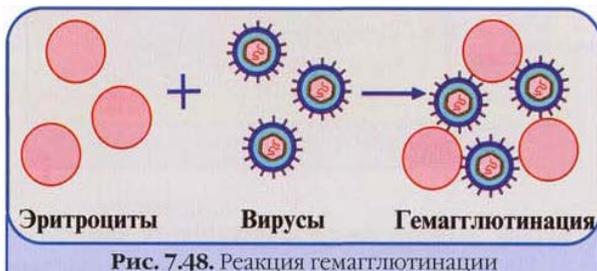
Присутствие в кровотоке нейтрализующих вирус антител – это важный фактор предотвращения повторной инфекции. Действие антител, помимо нейтрализации внеклеточных вирионов, состоит в том, что они вызывают разрушение инфицированных вирусами клеток, активируя систему комплемента. Тем не менее, комплемент не рассматривается как главный фактор защиты против вирусов, т.к. при недостаточности компонентов системы комплемента не отмечено предрасположенности к тяжелым вирусным инфекциям у человека.

Основной механизм противовирусного иммунитета связан с клеточным иммунным ответом. Поскольку клетки, инфицированные вирусом, несут на своей мембране антигенные детерминанты вирусов, они становятся “мишенями” для Т-киллеров и клеток, участвующих в реакциях антитело-зависимой цитотоксичности (АЗЦТ). Причем, Т-киллеры способны распознавать инфицированные вирусами клетки организма и разрушать их в период ранней стадии репродукции вируса, прежде чем появиться новое поколение вирусных частиц.



Иммунные реакции в лабораторной диагностике вирусных инфекций.

Одним из наиболее важных этапов в лабораторной диагностике вирусных инфекций является выявление и типирование вирусов в исследуемом материале, а также обнаружение антител к антигенам вируса в сыворотке крови больных.



Реакция гемадсорбции. Многие зараженные вирусами клетки приобретают способность сорбировать на своей поверхности различные эритроциты (куриные, эритроциты человека, морских свинок, лошадей и др. животных), что связано с модификацией инфицированных

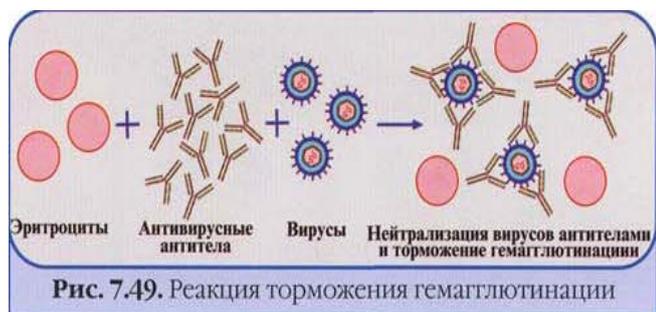
клеток вследствие в их цитоплазматической мембране гликопротеинов вируса. Феномен гемадсорбции проявляется на ранних сроках, до появления ЦПД и при его отсутствии.

Гемагглютинация – это феномен склеивания эритроцитов под действием вирусов. Некоторые вирусы имеют на своей оболочке рецепторы, способные связываться с рецепторами поверхности эритроцитов определенных животных (напр., вирус гриппа агглютинирует эритроциты курей, вирус клещевого энцефалита – эритроциты гусей). Т.о. в случае агглютинации можно сделать вывод о наличии вируса в исследуемом материале. Однако, эта реакция не является иммунологической, т.к. в ней не принимает участие система Аг-Ат.

Схема титрования вирусов в реакции гемагглютинации

Компоненты, мл	№ пробирки							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Физиологический раствор	-	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Вироусодержащий материал в разведении 1:10	0,2	0,2						

Разведение	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	-
1% взвесь куриных эритроцитов	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Инкубация при температуре 18-20°C в течение 30 мин								
Результаты								



Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) базируется на способности блокировать гемагглютинирующие свойства вирусов при помощи специфических антител. Данная реакция может быть использована для идентификации вируса или же для обнаружения вируснейтрализующих антител в сыворотке крови больного.

При идентификации вируса компонентами реакции являются неизвестный антиген (вирусосодержащий материал), специфические иммунные (диагностические) сыворотки, эритроциты. При определении титра антител в сыворотке больного компонентами реакции являются: сыворотка больного, известный антиген (диагностикум), эритроциты.

Реакция ставится в пробирках или специальных полистироловых планшетах с луночками.

Учет результатов реакции.

- отрицательная – образование красного зернистого с неровными краями осадка, который диффузно размещается на дне пробирки или лунки (“коврик”).

- положительная – отсутствие агглютинации эритроцитов, наличие компактного осадка в виде “пуговички” на дне пробирки или лунки.

РТГА применяют в лабораторной диагностике гриппа, паротита, кори, краснухи, клещевого энцефалита и др. вирусных инфекций

Схема реакции торможения гемагглютинации для диагностики вирусных инфекций

Компоненты, мл	Пробирки/лунки						Контроль	
	1	2	3	4	5	6	сыворотка и	антиген а
Физиологический раствор	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Сыворотка больного в разведении 1:50	I	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	---
	I	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	---
	I							
Разведение сыворотки	1:10 0	1:20 0	1:40 0	1:80 0	1:160 0	1:320 0	1:100	
Вирусный диагностикум	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		0,25
Инкубация в термостате при 37°C 30 мин								
2% взвесь куриных эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Результаты	I								
	I								
	I								

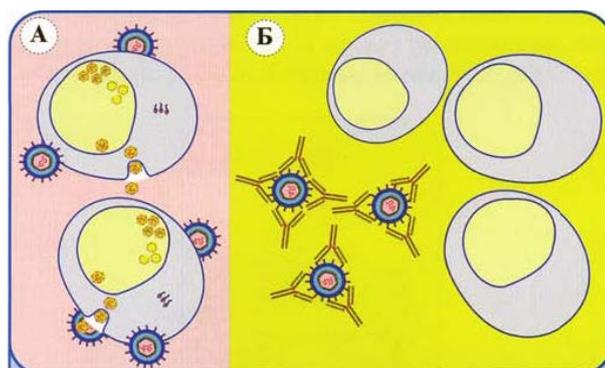


Рис. 7.56. Реакция нейтрализации вирусов в культуре клеток:
 А — цитопатогенный эффект (ЦПЭ) в результате размножения вирусов; Б — ЦПЭ отсутствует в результате предварительной нейтрализации вирусов антителами

Реакция нейтрализации основана на взаимодействии специфических антител иммунной сыворотки с вирусом, что приводит к нейтрализации последнего. Реакцию можно ставить в культурах клеток с учетом результатов ЦПД, в цветной пробе, при помощи рН-метрии и феномена бляшкообразования, а также можно использовать куриный эмбрион и лабораторных животных. Данная реакция может быть использована как с целью идентификации вируса, так и с целью установления титра антител в сыворотке крови

больного. Реакция часто используется при диагностике герпеса, гриппа, парагриппа, паротита, полиомиелита и др.

Р-ция нейтрализации в культуре клеток.

Компоненты реакции: вирусосодержащий материал, иммунная противовирусная сыворотка, среды для культивирования культур клеток и культура клеток в пробирках или флаконах (чаще всего используют культуры клеток HeLa, СМЦ, почек обезьян, первичные культуры клеток куриных эмбрионов и эмбрионов человека). При постановке реакции в пробирки с иммунной сывороткой вносят вирусосодержащий материал, а после инкубации при комнатной температуре на протяжении 30-60 мин добавляют однослойные клеточные культуры. Система инкубируется при 37°C в течение недели. Учет результатов ведут по наличию ЦПД. Его отсутствие свидетельствует о нейтрализации вируса специфической иммунной сывороткой.

Цветная проба предусматривает, что при взаимодействии вирусов с культурой клеток последние гибнут, рН среды остается щелочным и цвет индикатора не изменяется. При нейтрализации вируса антителами специфической сыворотки или при отсутствии соответствующих вирусов создаются условия для развития клеток. В живых клетках активно протекает обмен веществ, вследствие чего образуются кислые продукты клеточного метаболизма, что обуславливает сдвиг рН в кислую сторону. А это в свою очередь обуславливает изменение цвета индикатора фенолрота с красного (при щелочном рН) на соломенно-желтый или оранжевый (при кислом рН).

Реакция нейтрализации бляшкообразования заключается в том, что антитела специфической иммунной сыворотки, которые нейтрализуют вирусы, способствуют уменьшению числа бляшек — зон некроза — в однослойной культуре клеток. О нейтрализующей активности сыворотки судят по уменьшению числа и величины бляшек в сравнении с контролем без специфической сыворотки. Реакция считается позитивной, если число бляшек или их величина уменьшилась на 80% по сравнению с контролем.

Реакция нейтрализации на лабораторных животных или куриных эмбрионах. Лабораторное животное или куриный эмбрион заражают смесью вирусосодержащего материала и специфической иммунной сыворотки. При учете результатов учитывается

количество погибших эмбрионов или животных, образование зон некроза на хориоалантоисной оболочке куриных эмбрионов или оценивают степень нейтрализации вирусов по их гемагглютинирующей активности.

Реакция связывания комплемента (РСК) часто используется в диагностике вирусных инфекций (пригодна для диагностики практически всех вирусных инфекций). К особенностям РСК при диагностике вирусных инфекций принадлежит то, что ее можно ставить как при температуре 37°C (инкубация системы Аг-Ат-комплемента в течение часа), так и на холоде (+4°C на протяжении 18 часов), а также использовать микрометод (все ингредиенты берутся в объеме не 0,5 мл, а 0,25 мл).

Реакция иммунодиффузии основана на способности антител и антигенов диффундировать навстречу друг другу в полужидкой среде (агаровом геле). В зоне оптимальных соотношений (образования комплекса Аг-АТ) антигенов и антител образуются линии преципитации. Их число зависит от количества антигенов, которые отличаются своими эпитопами, т.к. каждая линия соответствует своей системе Аг-Ат. Существует более чувствительный тест – основанный на феномене иммунодиффузии в сочетании с электрофорезом – **встречный иммуноэлектрофорез** – чаще всего используется для выявления НbsАg вируса гепатита В или других вирусных антигенов обладающих негативным зарядом. Тест основан на способности антигенов с негативным зарядом двигаться в направлении анода, а антител сыворотки, обладающих положительным зарядом, - в направлении катода при пропускании постоянного тока.



Рис. 7.61. Прямая РИФ

Метод флуоресцирующих антител (МФА) или реакция иммунофлуоресценции (РИФ) – используется для выявления и идентификации вирусов как в исследуемом материале, так и в предварительно зараженных культурах клеток. Принцип метода заключается во взаимодействии антигенов и антител, предварительно меченых флюорохромом (родамин – дает красное свечение или флюоресцеинизотиоционат натрия – дает зеленое свечение в УФ-лучах). При **непрямом методе** (реакция **непрямой иммунофлуоресценции -РНИФ**) – однослойную культуру клеток на предметном стекле заражают исследуемым вирусосодержащим материалом и инкубируют несколько дней. После этого стекла фиксируют в ацетоне и наносят специфическую сыворотку, инкубируют во влажной камере, отмывают от излишков сыворотки и наносят тонкий слой флуоресцирующей антисыворотки, затем отмывают, подсушивают и исследуют под люминисцентным микроскопом, наблюдая характерное свечение.

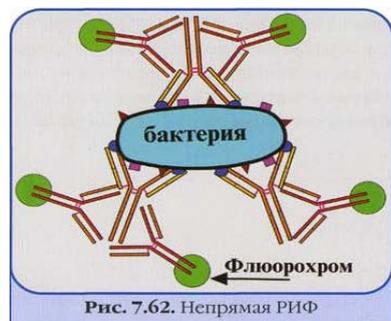


Рис. 7.62. Непрямая РИФ

Реакция пассивной (обратной) непрямой гемагглютинации (РПНГ) используется для выявления вирусных антигенов в исследуемом материале. Суть ее состоит в том, что эритроциты человека и животных, нагруженные специфическими противовирусными антителами, способны взаимодействовать с вирусными антигенами, вследствие чего склеиваются и выпадают в осадок. Компоненты реакции: эритроциты, обработанные таниновой кислотой с адсорбированными на них молекулами антител

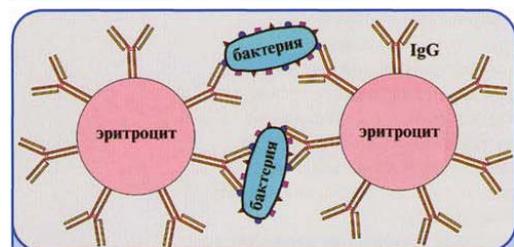


Рис. 7.44. Реакция обратной непрямой гемагглютинации

(сенсibilизированные эритроциты), вирусные антигены и раствор электролита. Реакция ставится в пробирках, лунках, на стекле, в капиллярах, микрометодом. При положительной реакции наблюдается выраженная агглютинация эритроцитов с образованием осадка с неровным волнистым краем, который равномерно распределяется по дну пробирки или лунки – “перевернутый зонтик”. При отрицательном – плотный, компактный осадок с ровным краем – “пуговичка”.

Кроме перечисленных реакций в настоящее время широко используют РИА (радиоиммунный анализ), ИФА (иммуноферментный анализ), вестерн-блот, ПЦР (полимеразная цепная реакция), метод гибридизации нуклеиновых кислот, ИЭМ (иммунная электронная микроскопия) и др.

Особенность серологических исследований при вирусных инфекций – исследование парных сывороток. Первую сыворотку берут у больного в острый период в начале болезни, хранят при $t = 4-8^{\circ}\text{C}$ или в замороженном состоянии при -20°C , а вторую – через 10-14 дней. Сыворотки исследуют одновременно! О болезни свидетельствует **сероконверсия**, т.е. нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой (диагностическое значение имеет сероконверсия в 4 раза и выше).

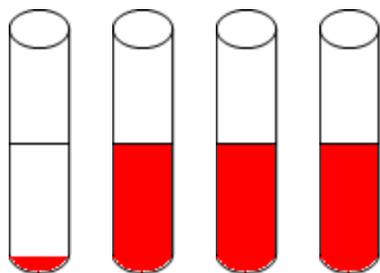
Рекомендации по оформлению протокола.

Задание 1. Ознакомиться с особенностями серологической диагностики вирусных инфекций и провести учет РСК, поставленной с целью серологической диагностики вирусной инфекции.

Особенности серологической диагностики вирусных заболеваний.

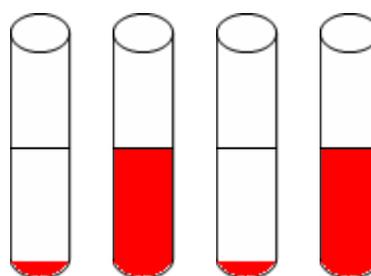
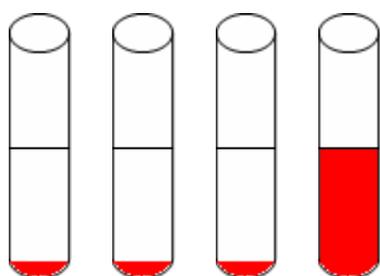
1. Антитела выявляют в парных сыворотках, первую берут в начале болезни, вторую – через 2 недели.
2. Из сывороток удаляют вирусные ингибиторы.
3. Реакция считается положительной, если титр антител во 2-й сыворотке увеличился в 4 и больше раз.

Схема постановки РСК при вирусных инфекциях.



1:20 1:40 1:80 1:160

Разведения первой сыворотки больного



1:20 1:40 1:80 1:160
 Разведения второй сыворотки больного
 1 2 3 4

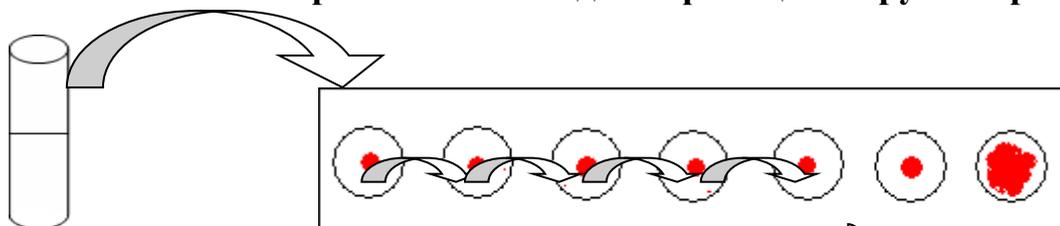
Контроли
 5 6 7 8

Содержимое пробирок: 1-4 - разведения исследуемой сыворотки (сыворотка + антиген + комплемент), 5 - контроль антигена на антикомплементарность (антиген + комплемент + физраствор + гемолитическая система), 6 - контроль антигена на гемотоксичность (антиген + физраствор + гемолитическая система), 7-8 контроль антигена нормальной ткани на гемотоксичность и антикомплементарность.

Особенностью РСК в вирусологии является осуществление связывания комплемента на холоде (в течение ночи при +4°C), а также включение дополнительного контроля с так называемым нормальным антигеном (антигеном из клеток, в которых репродуцировался вирус).

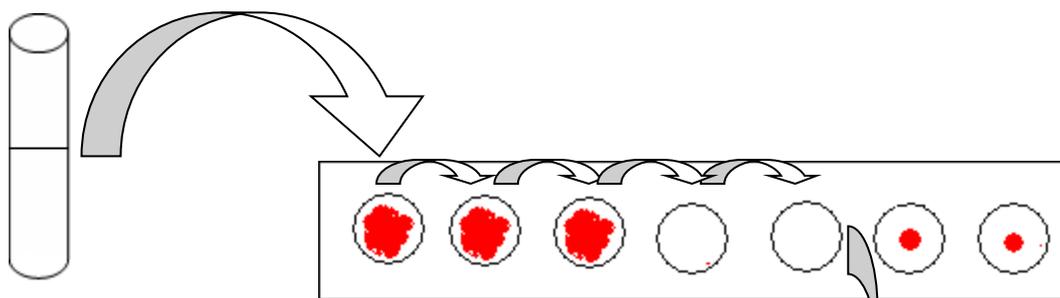
Задание 2. Ознакомиться со схемой постановки и провести учет реакции торможения гемагглютинации, поставленной с целью серологической идентификации вирусной инфекции.

Схема постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с целью серологической идентификации вирусов гриппа



Диагностическая
 гриппозная А сыворотка
 титр 1:320

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 КСА КЭ



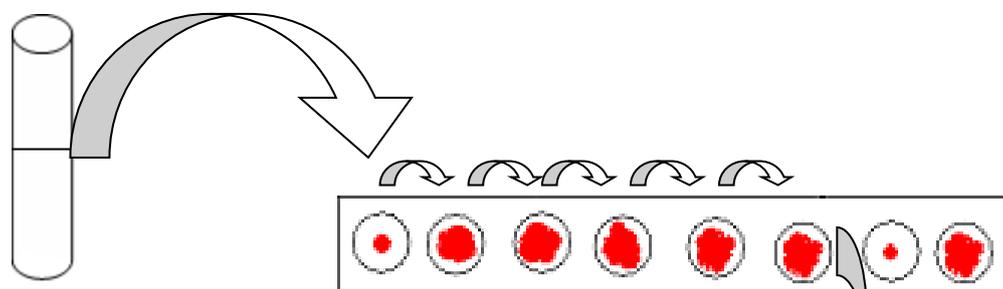
Диагностическая
 гриппозная В сыворотка
 титр 1:160

1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 КСА КЭ

по 0,25 мл физ. раствора
 по 0,25 мл выделенного вируса
 по 0,25 мл 1% суспензии куриных эритроцитов

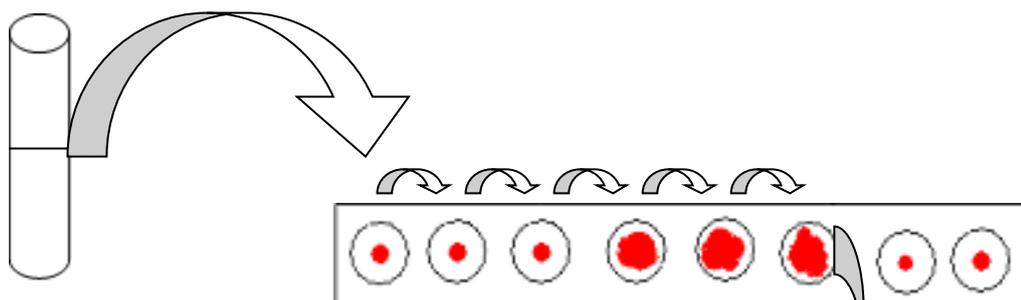
Задание 3. Ознакомиться со схемой постановки и провести учет реакции торможения гемагглютинации, поставленной с целью серологической диагностики вирусной инфекции.

Схема постановки реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с целью серологической диагностики гриппа



1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 КС1 КДА

Сыворотка больного
(рабочее разведение 1:10)
начало болезни



1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 КС1 КДА

Сыворотка больного
(рабочее разведение 1:10)
Взята через 2 недели

Вопросы для самоконтроля.

- Какие биологические модели можно использовать для постановки реакции нейтрализации вирусов?
- Каковы особенности серологической диагностики вирусных заболеваний?
- С какой целью при серологической диагностике вирусных инфекций берутся парные сыворотки?
- Особенности постановки реакции связывания комплемента при вирусных инфекциях.
- Что такое гемолитическая сыворотка и как ее получают?
- Что такое гемолитическая система?

- Какие дополнительные контроли нужно поставить при постановке реакции связывания комплемента в вирусологии.

Рекомендованная литература.

Основна:

1. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія. За ред. акад. НАН України В.В. Широбокова. Вінниця. Нова книга. 2011.- С.109-127.
2. К.Д. Пяткін, Ю.С. Кривошеїн. Мікробіологія, К., 1982. Стор. 38-41, 44.
3. С.І. Климнюк, І.О. Ситник, М.С. Творко, В.П. Широбоков. Практична мікробіологія. Тернопіль, 2004. Стор.316-329.

Додаткова

1. Словник по мікробіології, вірусології, імунології та інфекційним захворюванням. Загальна ред. Г.К. Палій, К., 2004.
2. Лекционный материал.

Практическое занятие № 15.

Субмодуль №2 по теме «Инфекция и иммунитет. Общая вирусология».

Вопросы для подготовки:

Инфекция и иммунитет

1. Инфекция. Факторы, обуславливающие возникновение инфекционного процесса. Роль микроорганизмов в инфекционном процессе. Патогенность, вирулентность, единицы измерения, методы определения. Факторы патогенности микроорганизмов, их характеристика.
2. Токсины микробов (экзо - и эндотоксины). Свойства и химический состав, получение, измерение силы действия экзотоксинов. Роль в патогенезе и иммуногенезе инфекционных заболеваний.
3. Роль макроорганизма в инфекционном процессе. Иммунологическая реактивность организма ребенка. Влияние окружающей среды и социальных условий на возникновение и развитие инфекционного процесса у человека. Персистенция бактерий и вирусов. Понятие о рецидиве, реинфекции, суперинфекции.
4. Учение об иммунитете. Этапы развития иммунологии. Виды иммунитета и формы его проявления.
5. Неспецифические факторы защиты организма от патогенных микробов. Комплемент, его свойства, пути активации. Фагоцитоз, виды фагоцитирующих клеток. Стадии фагоцитоза. Завершенный и незавершенный фагоцитоз.
6. Иммунная система организма, ее органы. Роль вилочковой железы в иммунном ответе. Клетки иммунной системы, их разновидности, взаимодействие Т- , В- лимфоцитов и макрофагов. Их роль в клеточном и гуморальном иммунитете.
7. Закономерности иммунного ответа организма. Фазы иммунного ответа. Иммунологические реакции. Иммунологическая толерантность, причины ее возникновения. Иммунологическая память, ее механизмы.
8. Гиперчувствительность немедленного и замедленного типа, их механизмы, различия. Практическое значение.

9. Схема кооперации компартментов иммунного ответа. Роль отдельных клеток иммунной системы, их взаимодействие. Интерлейкины.

10. Антигены, их характеристика. Полноценные и неполноценные антигены. Антигенная структура бактерий. Практическое значение учения о антигенах микробов. Аутоантигены.

11. Живые вакцины, принципы получения. Контроль, практическое использование живых вакцин, оценка эффективности.

12. Вакцины. История получения. Классификация вакцин. Корпускулярные, химические, синтетические, генноинженерные и антиидиотипические вакцины.

13. Химические вакцины и анатоксины, принципы получения. Ассоциированные вакцины. Адсорбированные вакцины, принцип «депо».

14. Анатоксины, их получение, очистка, единицы измерения, использование, оценка.

15. Корпускулярные вакцины из убитых микробов. Принципы получения, контроль, оценка эффективности.

16. Антитела, их природа. Место синтеза, динамика продукции антител. Аутоантитела.

17. Антитоксины, их свойства, механизм действия. Принципы получения антитоксических сывороток. Единицы измерения, практическое использование.

18. Серологические реакции, их характеристика, основные типы, практическое использование. Реакция агглютинации, ее механизм, разновидности. Практическое использование.

19. Серологические реакции. Реакция преципитации, ее механизм. Использование в медицинской практике. Реакция преципитации в геле.

20. Серологические реакции. Реакции лизиса. Реакция связывания комплемента, ее практическое использование.

21. Реакции с мечеными антителами или антигенами. Практическое использование реакции иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментного и радиоиммунного анализа.

Общая вирусология

1. История открытия и основные этапы развития вирусологии. Вклад отечественных ученых. Методы изучения вирусов, их оценка.

2. Морфология и ультраструктура вирусов. Типы симметрии вирусов. Химический состав, функции составных частей вирусов.

3. Современные взгляды на природу и происхождение вирусов. Место вирусов в системе живого.

4. Принципы классификации вирусов. Основные свойства вирусов человека и животных.

5. Методы культивирования вирусов и оценка их репродукции.

6. Серологические реакции, которые используют в вирусологии. Реакция вирусной нейтрализации, механизм, принципы использования, диагностическая ценность.

7. Реакции гемагглютинации и гемадсорбции. Механизм, практическое значение, использование, диагностическая ценность.

8. Реакция торможения гемагглютинации, ее механизм, условия постановки, принципы использования, диагностическая ценность.

9. Реакция связывания комплемента, ее суть, оценка. Особенности постановки реакции связывания комплемента при вирусных инфекциях.

10. Реакции с мечеными антителами и антигенами в вирусологии. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).

11. Использование клеточных культур в вирусологии. Классификация культур клеток. Питательные среды для культивирования клеток.

12. Виды взаимодействия вирусов и клеток. Характеристика продуктивного взаимодействия, этапы.

13. Особенности патогенеза вирусных инфекций. Острая и персистентная вирусные инфекции.

14. Иммунологические особенности вирусных инфекций. Факторы противовирусного иммунитета.

15. Методы обнаружения вирусов в культуре клеток и их оценка. Цитопатогенное действие вирусов, его виды.

16. Неспецифические факторы защиты макроорганизма от вирусных агентов, их характеристика. Интерфероны, механизм действия, интерферогены.

17. Вирусные вакцины, классификация, принципы получения, требования к ним, контроль, оценка эффективности.

Практическое занятие №16

Лабораторная диагностика гриппа и парагриппа. Лабораторная диагностика респираторно-синцитиальной, риновирусной и аденовирусной инфекции. Лабораторная диагностика паротита, кори, краснухи.

Актуальность темы.

Вследствие широкого распространения и высокого уровня заболеваемости, грипп и острые респираторные инфекции продолжают оставаться актуальной проблемой системы здравоохранения Украины. Ежегодно ими болеют свыше 13-20 млн. лиц, что составляет более 90 % всех зарегистрированных инфекций.

Своеобразие структуры и генетики возбудителей гриппа, их широкое распространение не только среди людей, но и среди животных, способность к интенсивной изменчивости и, как следствие, возникновение тяжелых гриппозных эпидемий и пандемий - все это обуславливает научную и практическую значимость всех вопросов, связанных с гриппом. В результате новых экологических и социально-экономических условий, загрязнения окружающей среды, глобального потепления, изменяется круг естественных хозяев возбудителей гриппа, контакты между ними, формируется почва для возникновения новых типов гриппозных вирусов. Существует абсолютно реальная угроза появления пандемического штамма возбудителя при рекомбинации вирусов гриппа человека и птиц. Последствия такой пандемии могут быть катастрофическими в глобальном масштабе. Все это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

Цель занятия:

Общая: Уметь выбирать методы лабораторной диагностики, профилактики вирусов гриппа, кори и паротита.

Конкретная: Изучить биологические свойства вирусов гриппа, парагриппа, РС-вирусов, рино- и аденовирусов, вирусов кори, краснухи, паратита.

Уметь идентифицировать вирусы в инфекционном материале; проводить учет результатов серологических реакций, выбирать методы лабораторной диагностики заболеваний в зависимости от сроков болезни; знать препараты для лечения и специфической профилактики гриппа, кори и паротита.

3. Базовые знания, навыки, необходимые для изучения темы.

3.1. Знать ультраструктуры вирусов и методы их культивирования.

3.2. Знать антигенное строение и типы вирусных геномов.

3.3. Знать этапы и типы взаимодействия вирусов с клеткой.

3.4. Знать методы диагностики вирусных инфекций.

3.5. Знать виды вакцин, принципы профилактики вирусных инфекций.

4. Основные теоретические вопросы, подлежащие изучению.

4.1. Систематическое положение, ультраструктура, антигенное строение вирусов гриппа, кори и паротита.

4.2. Методы культивирования, индикации и идентификации вирусов гриппа, кори, паротита.

4.3. Эпидемиология и патогенез гриппа, кори, паротита.

4.4. Особенности лабораторной диагностики гриппа.

4.5. Лабораторная диагностика кори, паротита. Особенности вирусологического и серологического методов.

4.6. Методы пассивной и активной профилактики заболеваний и препараты для лечения гриппа, кори и паротита.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.

Термин	Определение
Вирусные гликопротеины	Структурные поверхностные белки внешних оболочек сложных вирусов. Вирусные гликопротеины являются специфическими антигенами. Основной функцией вирусных гликопротеинов является взаимодействие со специфическими рецепторами поверхности клеток, то есть специфическая адсорбция вируса на клетках. Другой их функцией является участие в слиянии вирусной и клеточной мембран, проникновении вирусов в клетку и раздевании (высвобождении геномов).
Антигенный шифт	Изменчивость вируса гриппа, приводящая к появлению штаммов с полностью новыми поверхностными гликопротеинами, то есть сопровождается радикальным обновлением антигенов возбудителя.
Антигенный дрейф	Частичные изменения определенного гемагглютинина, при которых происходит замена одной или нескольких аминокислот в результате точечных мутаций, что приводит к появлению штаммов с незначительно обновленными антигенными свойствами.
Вирусная популяция	Вирусная популяция - вирусы одного вида, происходящие из одной вирусной частицы. Репродуцируются в естественной или экспериментальной чувствительной системе и образуют в ней неограниченное количество поколений.
Адаптация вируса	Адаптация вируса - способность вируса интенсивно размножаться в культуре клеток нового хозяина или при изменении условий культивирования.

Теоретические вопросы к занятию:

- Общая характеристика и классификация ортомиксовирусов. Классификация вирусов гриппа человека.
- Общая характеристика вирусов гриппа: структура и особенности генома, химический состав и антигенное строение.
- Резистентность вирусов гриппа, чувствительность к физическим и химическим факторам.
- Методы культивирования ортомиксовирусов.
- Источник инфекции и механизм передачи гриппа.
- Патогенез гриппа, роль персистенции вируса в организме человека и животных в сохранении эпидемически значимых штаммов.

- Особенности лабораторной диагностики гриппа.
- Основы специфической профилактики и лечения гриппа.

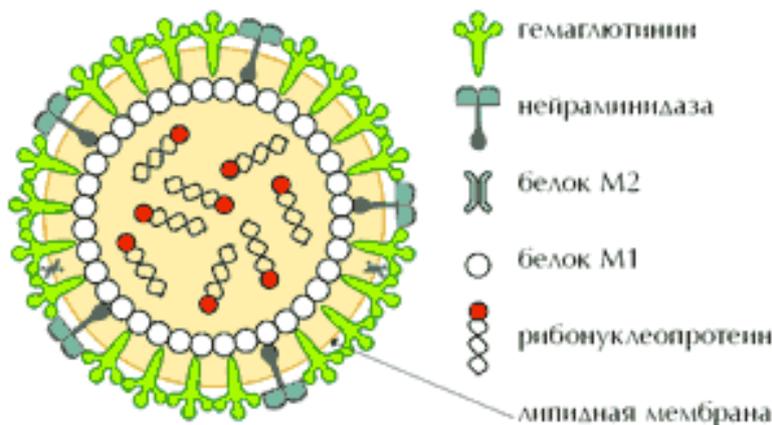
Практические задания, выполняемые на занятии:

1. Изучить схему вирусологической диагностики гриппа. Осуществить учет РГА с целью изучения и определения титра вируса, а также учет РТГА с целью серологической идентификации вирусов гриппа, сделать вывод.
2. Осуществить постановку РТГА с целью серологической диагностики гриппа, оценить результаты и сделать выводы.
3. Ознакомиться с диагностическими, профилактическими и лечебными препаратами, которые используются при гриппе.

Содержание темы.

Вирус гриппа относится к семейству Orthomyxoviridae, рода Influenzavirus. Вирус типа А открыли В. Смит, С. Эндрюс и П. Лейдлоу в 1933 г., вирус типа В выделили Е. Френсис, Р. Меджилл в 1940 г., вирус типа С – Р. Тэйлор в 1949 г. Вирус типа А вызывает грипп у человека, млекопитающих и птиц, а вирусы В и С – только у человека. Наибольшую роль в эпидемиологии вызывает вирус типа А.

Морфология: содержит однонитевую РНК, вирион сферической формы, диаметром 80-120 нм, сложный по строению.



Схематическое строение вируса гриппа

Антигенное строение: суперкапсид содержит два гликопротеида – N-нейраминидазу (N1, N2); H-гемагглютинин (H1, H2, H3). Основные функции H-гемагглютинина:

1. распознавание клеточного рецептора – мукопептида, имеющего N-ацетилнейраминовую кислоту;
2. обеспечение слияния мембраны вириона с мембраной клетки;
3. формирование протективных свойств.

Основные функции N-нейроминидазы:

1. обеспечение диссеминации вирионов путем отщепления нейраминовой кислоты от вновь синтезированных вирионов и мембраны клетки;
2. определение эпидемических свойств вируса.

Белок М – стабилизирующий белок, связывающий РНК с суперкапсидом.

Рибонуклеопротеид (белок NP) – капсидный белок, по его антигенам выделяют типы вируса гриппа (А, В, С) в РСК.

Внутренние белки (P1, P2, P3) - это белки полимеразного комплекса, участвующие в транскрипции и трансляции, в процессе репродукции вируса. P2 - транспортный белок.

Описаны 2 антигенных комплекса, освобождающиеся при обработке вирусных частиц эфиром; это S- и V- антигены.

S- антиген (растворимый) связан с нуклеопротеином, отличается стабильностью, неинфекционен. Выявляется в РСК и является типоспецифическим. V-антиген – штаммоспецифический, состоит из гемагглютинина и нейраминидазы, располагается на шипиках, определяет вирулентность. Выявляется в РТГА.

Резистентность

Устойчивость вирусов во внешней среде вне организма человека невелика: при 22⁰С они инактивируются через несколько часов. Плохо переносят повышенную температур: при 65⁰С погибают через 5-10 минут, при 100⁰С – мгновенно. Чувствительны к высушиванию, действию ультрафиолетовых лучей и обычных дезинфектантов: эфира, спирта, дезоксихолата. Вирусы хорошо сохраняются при глубоком холоде (-70⁰С)

Репродукция вирусов.

1. Адсорбция на рецепторах чувствительных клеток, содержащих сиаловую кислоту, происходит за счет гемагглютининов.

2. Проникновение в клетку осуществляется путем рецепторного эндоцитоза с последующим слиянием мембран вируса со стенкой клеточной вакуоли.

3. Депротенинизация: вирус освобождается сначала от липопротеидной оболочки, затем – и от капсидных белков.

4. Вирусная РНК проникает в цитоплазму клетки, затем – в ядро, где имеется продукт, необходимый для транскрипции и трансляции. Здесь синтезируется РНК. Белки NP, P1, P3, M синтезируются в цитоплазме на рибосомах.

5. Сборка НК происходит в цитоплазме клетки.

6. Выход из клетки осуществляется путем почкования или взрыва (лизиса).

Культивирование.

Вирусы гриппа можно выращивать а организме чувствительных животных (белые мыши, крысы, хорьки и т.д.); в развивающихся куриных эмбрионах; в первичной культуре клеток почек эмбриона человека и некоторых животных (например, телят) и в перевиваемых клетках.

Эпидемиология.

Источником инфекции является человек (больной или носитель). Основной **механизм передачи** заболевания – аэрогенный, **путь передачи** - воздушно-капельный или воздушно-пылевой, реже – контактный. Инкубационный период короткий - 1-2 суток. Отмечается выраженная сезонность заболевания - осенне-зимний или зимне-весенний период. Спад эпидемии обычно связан с формированием коллективного иммунитета.

Патогенез. Вирус адгезируется и проникает в клетки цилиндрического эпителия слизистой оболочки верхних дыхательных путей, с преимущественной локализацией в области трахеи (отсюда – мучительный сухой кашель), где он размножается и

разрушает инфицированные клетки, клинически это проявляется сухим болезненным кашлем.

Иммунитет.

Большое значение имеют факторы неспецифической противовирусной защиты организма, состояние местного иммунитета, уровень секреторного IgA. Постинфекционный иммунитет - гуморальный и клеточный, длительный, но он не только тип-, но и штаммоспецифический.

Материалом для исследования являются смывы из носоглотки, выделения из носа, кровь, спинномозговая жидкость, секционный материал. При проведении вирусологического исследования чувствительным методом выделения вируса является заражение 10-11 дневных куриных эмбрионов. При серологическом исследовании проводят определение титра антител в парных сыворотках больного с помощью РТГА и РСК. Применяют биологический метод: заражение исследуемым материалом белых мышей или хомячков. Для экспресс-диагностики используют риноцитоскопию, РИФ и ПЦР. Постинфекционный иммунитет: напряженный, длительный, типоспецифический. Для профилактики гриппа применяют живую аттенуированную (из вирусов, которые спонтанно или в результате селекции утратили вирулентность, но сохранили иммуногенность), убитую цельновирионную (инактивированные), субвирионную, рекомбинантные, химические (субъединичные), вакцины и противогриппозный гамма-глобулин.

Методические рекомендации для преподавателей: На практическом занятии студенты изучают морфологические, физико-химические свойства, ультраструктуру и антигенное строение представителей семейства *Orthomyxoviridae*, виды и механизмы антигенной изменчивости.

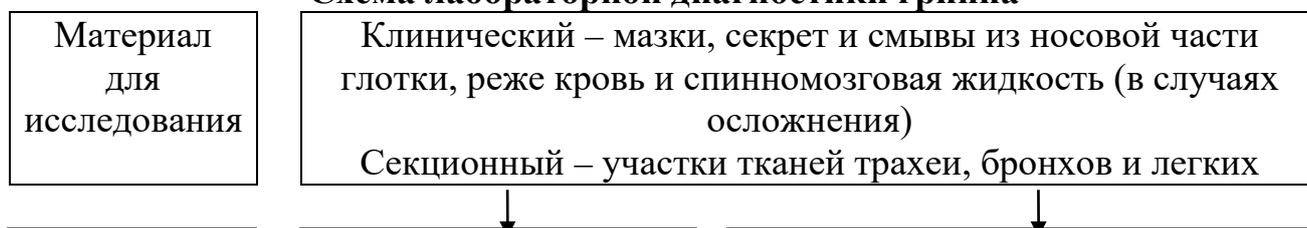
Составляя схему лабораторной диагностики, студенты используют знания, приобретенные во время самостоятельной подготовки и в процессе рассмотрения темы на занятии. Проводят учет реакций и оценивают результаты (определяют наличие вируса в РГА, проводят учет РТГА, поставленной с целью серологической идентификации вирусов гриппа, осуществляют учет РТГА, поставленной с целью серологической диагностики гриппа). Знакомятся и вносят в протокол названия препаратов, которые используются для лабораторной диагностики и профилактики гриппа: гриппозные диагностикумы, диагностические сыворотки, вакцины: живые, инактивированные (цельновирионные), химические (сплит - вакцины, субъединичные), нормальный иммуноглобулин человека, различные виды интерферона.

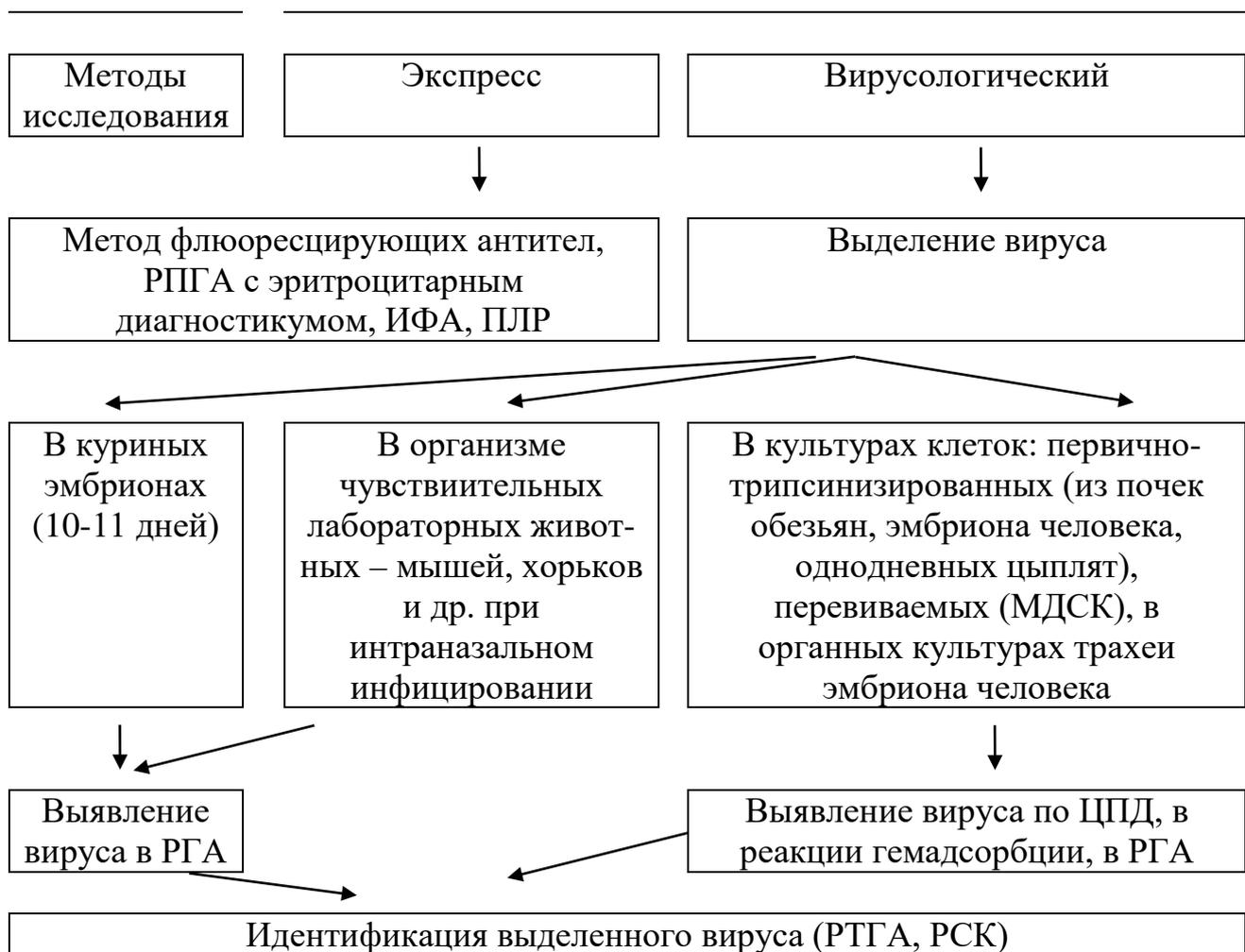
Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Рекомендации по оформлению протокола

Задание 1. Ознакомиться со схемой лабораторной диагностики гриппа.

Схема лабораторной диагностики гриппа





Характерной особенностью вирусов гриппа, в основном типа А, является изменчивость антигенов Н и N. Известно три разновидности Н и две разновидности N. зависимости от их сочетания выделяют три подтипа вируса гриппа А человека:

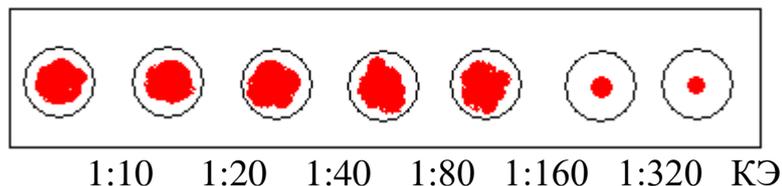
H1N1, H2N2, H3N2, соответственно А1, А2, А3. Внутри подтипов есть множество антигенных вариантов, отличающихся по структуре Н и N-антигенов. Внутренние структуры вируса экранированы от действия внешней среды и не изменяются. Изменчивость присуща антигенам суперкапсида, причем гемагглютинины и нейраминидаза изменяются независимо друг от друга благодаря 2 генетическим механизмам - дрейфу и шифту.

Антигенный дрейф (от английского слова дрейф – медленное течение) вызывает незначительные изменения, обусловленные точечной мутацией, причем в большей степени происходит изменение структуры гемагглютинина. Это приводит к развитию штаммовых различий. В результате антигенного дрейфа могут возникать эпидемии (через 3-4- года).

Шифт – (от английского слова сдвиг, скачок) - это полная замена гена, которая приводит к появлению нового антигенного варианта вируса. Полагают, что шифт - это результат генетической рекомбинации, т.е.обмена генетической информации между вирусами человека и животных, который приводит к смене подтипа НА или NA (а иногда – обоих). Такая изменчивость может привести к появлению новых вариантов вирусов, способных вызывать пандемию.

Вирусы гриппа В и С лишены штаммовой изменчивости, поэтому вирусы гриппа В редко вызывают эпидемии, а вирусы гриппа С обладают еще меньшей изменчивостью и вызывают спорадические заболевания или небольшие вспышки.

Задание №2. Осуществить учет РГА с целью выявления вируса с гемагглютинирующими свойствами.



Задание 3. Осуществить учет РТГА, поставленной с целью серологической идентификации и серологической диагностики гриппа (схему см. занятие №18).

Задание 4. Изучить препараты для специфической профилактики гриппа.

1. Вакцина гриппозная аллантоисная живая сухая для интраназального введения (1 поколение вакцин, Россия).

2. Очищенная инактивированная сплит-вакцина для профилактики гриппа "Ваксигрипп" (Франция).

3. Инактивированная субъединичная вакцина "Инфлувак" (Нидерланды).

Вопросы для самоконтроля.

- К какому семейству принадлежат вирусы гриппа?
- Какова морфология вируса гриппа?
- Какова стратегия генома вируса гриппа?
- Какие белки определяют специфичность штамма вируса гриппа?
- Каков механизм антигенного шифта вируса гриппа?
- На каких биосистемах чаще всего осуществляют выделение вирусов гриппа?
- Какой метод профилактики гриппа у взрослых является наиболее эффективным?

Согласно прогнозам ВОЗ, в сезон 2016-2017 в Украине будут циркулировать 3 штамма гриппа: A/California/7/2009 ([калифорнийский грипп](#) H1N1), A/Hong Kong/4801/2014 (гонконгский грипп H3N2) и B/Brisbane/60/2008 (грипп Брисбен H2N3).

Сегодня для иммунизации населения в Украине одобрено две вакцины: [Ваксигрипп](#) (Vaxigrip, Sanofi Pasteur, Франция) и ДжиСи Флю (GC Flu, Green Cross Corporation, Корея)

ОРЗ – острые инфекционные заболевания, характеризующиеся поражением слизистых оболочек верхних дыхательных путей.

Наиболее распространенные вирусы – возбудители ОРЗ

Семейство	Род	Тип НК	Организация Вируса	Тип симметрии
Аденовирусы	Мастоденовирус Аденовирус	ДНК	Простая	Кубический
Ортомиксовирусы	Инфлюенсавирус	РНК	Сложная	Спиралевидный
Парамиксовирусы	Пневмовирус Морбилливирус	РНК	Сложная	Спиралевидный
Пикорнавирусы	Риновирус Энтеровирус	РНК	Простая	Кубический
Коронавирусы	Коронавирус	РНК	Сложная	Спиралевидный

Общие свойства возбудителей:

- широкое распространение в природе,
- если они малоустойчивы во внешней среде, то высоко контагиозны и наоборот, если устойчивы, то контагиозность у них менее выражена,
- они распространяются, в основном, воздушно-капельным путем, кроме аденовирусов и коронавирусов, которые могут распространяться еще и фекально-оральным механизмом.
- клиническая картина вызываемых этими вирусами заболеваний сходна, они все протекают в виде воспаления верхних дыхательных путей без признаков интоксикации, они могут проявляться не только как острые заболевания, но и как латентные.

Семейство парамиксовирусов (*Paramyxoviridae*)

Парагрипп (мнимый грипп) – острое инфекционное заболевание, характеризующееся преимущественным поражением верхних дыхательных путей и протекающее с синдромом интоксикации. Впервые вирусы парагриппа выделили Р.Чанок (1956-1957 г.г.) из носоглоточных смывов детей с гриппоподобными заболеваниями путем заражения клеточных культур почек обезьян. Вирусы были похожи на вирусы гриппа, почему и получили название «парамиксовирусы».

Таксономия.

В семейство *Paramyxoviridae* включены 4 рода, включающие возбудителей, патогенных для человека: *Paramyxovirus* – (вирусы парагриппа 1 и 3 серотипов), *Rubulavirus* (вирусы парагриппа 2 и 4 типов и вирус эпидемического паротита), *Morbillivirus* – (вирус кори, подострого склерозирующего панэнцефалита, чумы крупного рогатого скота и собак), *Pneumovirus* – респираторно-синтициальный вирус (RS).

Морфология.

Эти вирусы имеют спиральную симметрию, диаметр – 120 –200 нм, вирус – сложноорганизованный. Суперкапсид состоит из 2 липидных слоев, на поверхности гликолипидного слоя имеются шипики длиной 8-10 нм. По химической природе это – гликопротеины NH, обладающие гемагглютинирующей и нейраминидазной активностью. Белки NH выполняют роль адгезинов. Имеется также F- (ответственный за слияние мембран вируса и чувствительной клетки, проявляет симпластообразующую,

гемолитическую и цитотоксическую активности) и М-белок, формирующий внутренний слой вирусной оболочки.

Геном представлен несегментированной 1-нитевой линейной молекулой (-) РНК. Она окружена мембранным белком М. С вирусной РНК тесно связан белок NH и полимеразные белки Р и L, образующие нуклеокапсид со спиральным типом симметрии (см. рис.). В составе белков Р и L имеется РНК-полимераза (транскриптаза).

Таким образом, вирус обладает нейраминидазной, гемагглютинирующей и симпластообразующей активностью.



Химический состав.

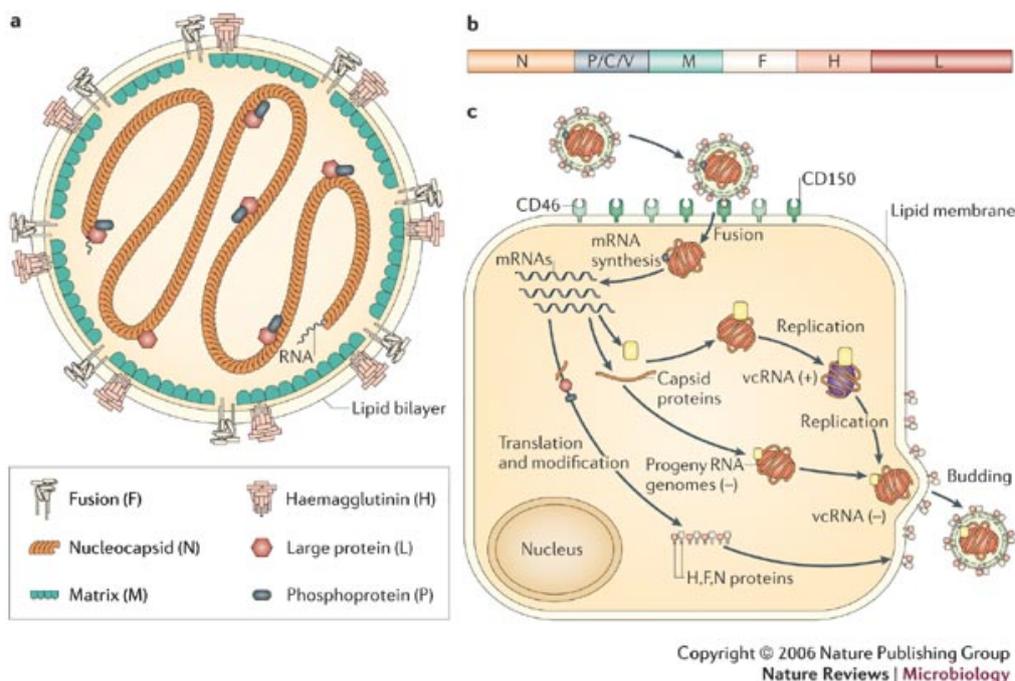
Вирус содержит: белков – 70%, РНК – 3%, липидов – 20-25%, углеводов – 6%.

Антигены

Имеются 2 видоспецифических антигена- S (связан с нуклеокапсидом) и наружный V-антиген (гликопротеины шиповидных отростков). У ряда парамиксовирусов V-антиген содержит 2 самостоятельных антигена: Н-гемагглютинин и N-нейраминидазу

Особенности репродукции.

Вирус парагриппа человека прикрепляется к чувствительным клеткам слизистой верхних дыхательных путей за счет NH белков. В отличие от вирусов гриппа, размножение происходит в цитоплазме клеток. Выход из клетки происходит путем почкования.



Культивирование.

Вирусы парагриппа плохо развиваются в куриных эмбрионах, поэтому их выращивают, в основном, в первично-трипсинизированных клетках почек обезьян (макаки резус). Менее чувствительны культуры клеток почек эмбриона человека и перевиваемые клетки.

Для индикации применяют реакцию гемадсорбции; используется также феномен цитопатического действия вируса на клетки, оно проявляется неодинаково при росте разных типов вируса. Для вирусов I типа характерно появление зернистости пораженных клеток, эти клетки отпадают от стекла. Вирусы II типа образуют многоядерные симпласты. Идентификация осуществляется с применением серологических реакций со специфическими сыворотками.

Резистентность.

Вирусы парагриппа чувствительны к не благоприятным факторам внешней среды. При температуре 36-37°C вирусы вне клетки инактивируются, при 18-20 °C происходит падение их биологической активности через 5-7 суток.

Эпидемиология.

Источником инфекции являются больные с выраженной или стертой клинической картиной заболевания, а также вирусоносители. Механизм передачи – аэрогенный, путь – воздушно-капельный, реже вирус передается контактным путем. Отмечается осенне-летняя сезонность заболевания.

Роль в патологии.

Вирусы парагриппа вызывают ОРЗ, ринит с сухим кашлем и охриплостью голоса.

Патогенез.

Попадая в организм, вирусы внедряются в клетки слизистых оболочек верхних дыхательных путей, разрушают их, вызывая воспаление, нередко – отек гортани. Затем следует этап вирусемии. Развивается интоксикация.

Клинические особенности. Инкубационный период составляет 3-5 дней. Затем повышается температура, появляется кашель, охриплость голоса. Более тяжело

болезнь протекает у детей, особенно – у детей до 1 года. У них возможны осложнения: пневмония, ложный круп, бронхопневмония.

Иммунитет

У переболевших формируется постинфекционный иммунитет, гуморальный, типоспецифический. Сохраняется в течение нескольких лет.

Профилактика

Проводится неспецифическая профилактика. Специфическая не разработана.

Микробиологическая диагностика.

Экспресс - диагностика – РИФ. Вирусологический метод предусматривает заражение исследуемым материалом культур клеток почек эмбриона человека или обезьян. Индикация проводится по цитопатическому действию и по тесту гемадсорбции. Идентификация - в РТГА или РН.

Вирусы парагриппа 1–2 типов агглютинируют эритроциты морской свинки, мышей, овец, кур. Вирусы парагриппа 3 типа не агглютинируют эритроциты кур. Вирусы 4 типа проявляют наиболее выраженное цитопатическое действие.

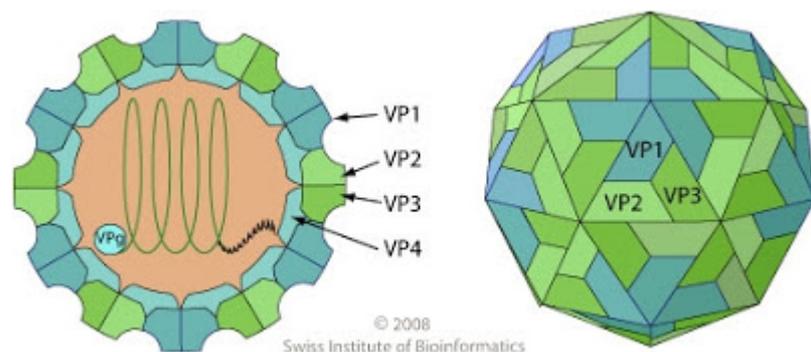
Серодиагностика проводится в РТГА с парными сыворотками.

Возбудители ОРВИ

Пикорнавирусы (семейство *Picornaviridae*)

Picornaviridae (от исп. *pico* - малый, *rna* - РНК) - семейство безоболочечных вирусов, содержащих однонитевую плюс РНК. Семейство насчитывает более 230 представителей и состоит из 9 родов: *Enterovirus* (111 серотипов), *Rhinovirus* (105 серотипов), *Aphthovirus* (7 серотипов), *Hepatovirus* (2 серотипа: 1 человека, 1 обезьяны), *Cardiovirus* (2 серотипа); *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus* - названия новых родов. Роды состоят из видов, виды - из серотипов. Все эти вирусы способны инфицировать позвоночных.

Структура. Пикорнавирусы относятся к мелким просто организованным вирусам. Диаметр вируса около 30 нм. Вирион пикорнавирусов лишен липидной оболочки (суперкапсида), т.е. является голым нуклеокапсидом. Капсид состоит из 12 пятиугольников (пентамеров) и построен по типу кубической (икосаэдральной) симметрии из одинаковых блоков (капсомеры, или протомеры), в состав которых входит по четыре белка — VP1, VP2, VP3 и VP4 (от англ. viral proteins). Белки VP1, VP2 и VP3 располагаются на поверхности вириона, а VP4 - внутри вирусной частицы. РНК имеет позитивную полярность, т.е. ведет себя как мРНК, напрямую обеспечивая синтез вирусных белков.



Риновирусы относятся к семейству *Picornaviridae*.

Вирионы имеют сферическую форму и кубический тип симметрии. Размер 20–30 нм. Геном образован положительной молекулой РНК, которая не сегментирована. Капсидная оболочка состоит из 32 капсомеров и 3 крупных полипептидов. Суперкапсидной оболочки нет.

Репликация вируса осуществляется в цитоплазме.

Вирусы теряют свои инфекционные свойства в кислой среде. Хорошо сохраняются при низких температурах. Необходимая для репликации температура равна 33 С.

Риновирусы разделяют на две группы:

1) вирусы группы Н. Размножаются и вызывают цитопатические изменения в ограниченной группе диплоидных клеток, человеческого эмбриона;

2) вирусы группы М. Размножаются и вызывают цитопатические изменения в клетках почек обезьян, эмбриона человека.

После перенесенного заболевания остается непродолжительный иммунитет.

Лабораторная диагностика:

1) выделение вирусов на культурах клеток, зараженных отделяемым носовых ходов;

2) экспресс-диагностика – иммунофлюоресцентный метод.

Лечение: симптоматическое.

Реовирусы относятся к семейству *Reoviridae*.

Вирионы сферической формы, диаметр 60–80 нм. Капсид построен по икосаэдрическому типу симметрии. Двунитевая РНК состоит из десяти фрагментов. В составе внутреннего и наружного капсидов восемь отдельных белков. Один из белков наружного капсида ответствен за связывание со специфическими клеточными рецепторами, с помощью другого вирус проникает в клетку.

Репликация вирусов происходит в цитоплазме клеток хозяина.

Различают три серотипа реовирусов. Они имеют общий комплементсвязывающий антиген и типоспецифические антигены (белок наружного капсида). Вирусы обладают гемагглютинирующей активностью.

Основной путь передачи – воздушно-капельный.

Реовирусы первично репродуцируются в эпителиальных клетках слизистой оболочки рта, глотки, тонкой кишки, регионарных лимфатических узлов, откуда они попадают в лимфу и кровь. Вирусы способны проходить через плаценту и оказывать эмбриопатическое действие.

Лабораторная диагностика:

1) выделение вируса в культуре клеток и у новорожденных мышей;

2) идентификация вируса – в реакции нейтрализации и РТГА;

3) серодиагностика (РТГА).

Специфическая профилактика и этиотропная терапия не разработаны.

Патогенные для человека вирусы, которые содержат **дезоксирибонуклеиновую кислоту** (ДНК), входят в состав 6 семейств: *Adenoviridae*, *Herpesviridae*, *Parvoviridae*, *Poxviridae*, *Herpadnaviridae*, *Papillomaviridae*.

По сравнению с вирусами, содержащими рибонуклеиновую кислоту (РНК), они генетически более консервативны, то есть менее изменчивы, и нередко способны к

длительной персистенции в организме хозяина. **Большинство ДНК-геномных вирусов репродуцируются в ядрах клеток.**

Семейство Adenoviridae разделяется на два рода: Mastadenovirus - аденовирусы млекопитающих, в том числе свыше 40 сероваров, вызывающих заболевания дыхательных путей и других органов у человека, обезьян, рогатого скота, собак, мышей, и Aviadenovirus - 14 сероваров, вызывающих заболевания у птиц.

Основные свойства аденовирусов.

1. Кубический (икосаэдрический) тип симметрии капсида;
2. Капсид состоит из 252 капсомеров: 240 гексонов; 12 пентонов с отростками;
3. ДНК линейная, около 30 генов.

Схема лабораторной диагностики аденовирусных инфекций.

1. Выделение и идентификация вируса →	Материал от больного	
	↓	↓
	Первичные и репрививаемые культуры клеток человека и обезьяны. ↓ 5 -14 суток ↓	Риноцитоскопия (окрашивание флюорохромами и мечеными сыворотками)
	ЦПД	Сероидентификация 1.РН 2.РТГА
2. Серологическая диагностика	Парные сыворотки от больного 1. РН; 2. РСК; 3. РТГА; 4. РНГА.	
3. Генетическая диагностика	ПЦР	

Препараты для лечения и профилактики аденовирусных инфекций.

- интерферон;
- ДНК-аза;
- оксолиновая мазь и др.;
- живые вакцины из 4, 7, 21 серотипов (в разработке).

Задание 1. Оценить результаты реакции пассивной гемагглютинации, поставленной с целью серологической диагностики аденовирусной инфекции (демонстрация).

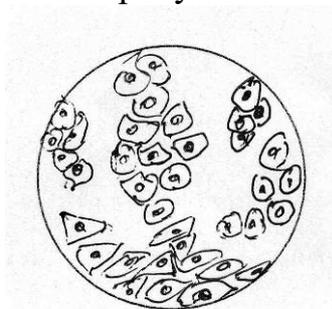
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	КЭД
I сыворотка (р/р 1:10)						
II сыворотка						

(р/р 1:10)

Примечания: р/р - рабочее разведение

КЭД - контроль эритроцитарного диагностикума. Сделать вывод.

Задание 2. Изучить изменения в клетках, возникшие вследствие размножения аденовирусов. Зарисовать в протокол рисунки.



Гроздьобразование,
вызванное
аденовирусами

ВИРУС ПАРОТИТА.

Эпидемический паротит, или свинка – острая вирусная инфекция с преимущественным поражением околоушных желез («свинка») у невакцинированных детей, сопровождающаяся лихорадкой и интоксикацией.

Вирус паротита выделен впервые К. Джонсоном и Э. Гудпасчуром в 1934 г. из слюны больного путем заражения ею обезьян в проток слюнной железы, а позднее – посредством заражения куриных эмбрионов и клеточных культур.

Таксономия.

Семейство – Paramyxoviridae, род - Paramyxovirus, вид – вирус паротита. Вирус сходен с другими парамиксовирусами.

Морфология.

Форма вируса – круглая или овальная, организация – сложная, тип симметрии - спиралевидный. Суперкапсид имеет на своей поверхности шипики. Размеры вируса – средние. *Геном* представлен односпиральной (-) нить РНК.

Белки и антигены

Вирус содержит внутренний белок NP и поверхностный F –белок.

Вирус проявляет нейраминидазные, гемадсорбирующие, симпластообразующие свойства. Антигенными свойствами обладают белок NP, поверхностный белок NH и F-гликопротеины. Известен 1 серовар вируса эпидемического паротита.

Вирус содержит S - и V-антигены: V-антиген поверхностный, с ним связаны инфекционные и гемагглютинирующие свойства. S- антиген (растворимый) – это нуклеопротеид, обладающий гемагглютинирующей активностью.

Культивирование.

Вирус выращивают в 7 – 8 –дневных куриных эмбриона в течение 5-7 дней при температуре 33-35⁰С. Из первично-трипсинизированных клеток чаще всего

применяются культуры клеток фибробластов куриных эмбрионов. Перевиваемые клетки менее чувствительны к вирусу паротита. При культивировании в клетках наблюдается симпластообразование, в цитоплазме клеток формируются своеобразные включения. Пораженные клетки приобретают способность к гемадсорбции

Эпидемиология.

Источником инфекции являются больные люди. *Механизм заражения* – аэрогенный, *пути заражения* - воздушно-капельный, воздушно-пылевой. Наиболее восприимчивы дети до 5 лет, чаще болеют мальчики. Подъем заболеваемости наблюдается в холодное время года. Возможны вспышки заболевания.

Патогенез.

Входными воротами инфекции являются клетки слизистой верхних дыхательных путей, где и происходит первичная репродукция вирусов. Затем они проникают в кровь. У возбудителей имеется тропизм к клеткам железистой ткани, поэтому они фиксируются в яичках, яичниках, поджелудочной железе и в других органах. Чаще поражаются околоушные слюнные железы (поражения могут быть односторонними и двусторонними). Возможно развитие орхита у мальчиков, что может стать причиной бесплодия.

Клинические особенности

Заболевание начинается с воспаления околоушных желез. Одновременно повышается температура. Осложнения: орхит, менингит, менингоэнцефалит, реже - полиартрит, панкреатит, нефрит.

Иммунитет

У переболевших вырабатывается постинфекционный, гуморальный, стойкий, напряженный, пожизненный иммунитет. Дети первого года жизни невосприимчивы к паротиту за счет материнских антител, которые сохраняются до 6 месяцев.

Спустя 3-4 недели от начала заболевания формируется гиперчувствительность замедленного типа.

Профилактика

Практикуется плановая иммунизация, применяется вакцина Смородинцева – живая аттенуированная, из штамма Ленинград-3. Вакцину вводят в возрасте 18 месяцев в виде моновакцины или в ассоциации с коревой и краснушной вакцинами (тривакцина).

Микробиологическая диагностика

Применяются вирусологический и серологический методы исследования. Материалом для исследования служат: слюна, спинномозговая жидкость, пунктаты слюнных желез, моча. Возбудитель выделяют путем заражения 7-8-суточных культур клеток фибробластов куриного эмбриона. Индикация осуществляется по признакам симпластообразования, по результатам реакции гемадсорбции. Для идентификации ставятся реакции: РСК, РТГА, РН, РИФ с использованием диагностических специфических сывороток.

Серодиагностика проводится при постановке РСК, РТГА с парными сыворотками больных.

3.5. ВИРУС КОРИ

Корь – острое вирусное антропонозное заболевание, характеризующееся лихорадкой, интоксикацией, поражением верхних дыхательных путей; конъюнктивитом, пятнисто-папулезной сыпью.

Клинические особенности кори известны с древних времен (1X в). Вирусную природу кори обосновали в 1911 году Андерсон и Гльдберг. Вирус кори впервые выделили Д.Эндерс и Т.Пиблс в 1954 году. В 1960 г. Смородинцевым была разработана вакцина для профилактики кори

Таксономия

Семейство Paramyxoviridae, род - Morbillivirus, вид – вирус кори.

Морфология

Возбудитель имеет сходств с другими парамиксовирусами: сферическая форма, размеры – 120-150 нм в диаметре. Вирус – сложноорганизованный. Спиральный тип симметрии нуклеокапсида. Вирус– сложноорганизованный.

Геном представлен однонитевой молекулой (-) нитевой РНК.

Белки и антигены.

Суперкапсид окружен шипиками, состоящими из гемагглютининов (Н-антиген), F- белка. NP- белок связан с геномом. Имеются также полимеразные белки Р- и L-, образующие нуклеокапсид. Геном снаружи окружен матриксным белком М.

Основные антигены – это Н-антиген (гемагглютинин), белок F- и нуклеокапсидный белок NP. Все антигены обладают цитотоксической активностью по отношению к пораженным клеткам.

Все известные штаммы вируса принадлежат одному серологическому варианту.

Культивирование.

Вирус можно выращивать в первично-трипсинизированных культурах клеток почек обезьян или клеток эмбриона человека. Индикация осуществляется по цитопатическому действию (образованию гигантских многоядерных симпластов). В клетках, пораженных вирусом, появляются эозинофильные включения в цитоплазме. Куриные эмбрионы мало пригодны для выращивания вирусов кори.

Резистентность.

Вирус кори малоустойчив во внешней среде: при 37⁰С его активность снижается, при 60⁰ С наступает немедленная гибель. Губительно действуют на него и УФЛ. В высохших каплях слизи при 12-15⁰С сохраняется несколько дней. Вирус чувствителен к дезинфектантам.

Эпидемиология.

Источником инфекции являются больные люди. Пути передачи – воздушно-капельный и воздушно-пылевой. Наиболее восприимчивы к инфекции дети от 2 до 7 лет. Отмечается зимне-весенняя сезонность.

Патогенез.

Воротами инфекции являются клетки слизистой верхних дыхательных путей. В них и в региональных лимфоузлах происходит первичная репродукция вируса. Затем

вирусы проникают в кровь, поражают эндотелий кровеносных капилляров. Вследствие некроза клеток появляется сыпь. Вирус накапливается также в клетках макрофагальной системы. В пораженных клетках развиваются небольшие воспалительные инфильтраты с образованием многоядерных гигантских клеток. Вирус может также поражать легкие, конъюнктиву, центральную нервную систему.

Клинические особенности. Инкубационный период – 8-13 суток. В продромальном периоде инфекция напоминает ОРЗ. Специфические признаки: появление характерной сыпи на коже и пятен Филатова-Коплека на слизистой щек. Температура держится 7 – 8 дней. Возможны осложнения: отиты, пневмония и наиболее тяжелое – энцефаломиелит.

Иммунитет

У переболевших формируется постинфекционный, гуморальный, напряженный, прочный, пожизненный. Вместе с тем, считают, что вирус может остаться в организме и быть причиной развития рассеянного склероза, подострого склерозирующего панэнцефалита.

Профилактика

Для плановой иммунизации применяется живая коревая вакцина (ЖКВ), она готовится из вакцинного штамма вируса Ленинград-16. Вакцинация проводится в возрасте 18 месяцев.

Микробиологическая диагностика..

При экстренной диагностике применяют РИФ. При вирусологическом методе производится заражение первично-трипсинизированных клеток почек обезьян или клеток эмбриона человека. Индикация – по образованию в клеточной культуре симпластов. Идентификация осуществляется в РСК, РТГА с диагностическими иммунными сыворотками.

Дополнительный материал.

Химиотерапевтические средства для этиотропного лечения: амантадин, ремантадин блокируют проникновение вирусов в клетки макроорганизма; препараты рекомбинантного интерферона - блокируют синтез вирусных белков. Специфическую профилактику гриппа проводят противогриппозным гамма-глобулин, который изготавливают из сыворотки крови доноров, иммунизированных живой гриппозной вакциной типов А и В. Применяют для лечения и профилактики гриппа в эпидемических очагах. Живая гриппозная вакцина - изготавливают из аллантоисной жидкости куриных эмбрионов, инфицированных вакцинными штаммами вируса гриппа основных серотипов. Применяют также, инактивированные, рекомбинантные и химические вакцины для профилактики гриппа. Специфическую профилактику кори проводят противокоровым гамма-глобулин, живой аттенуированной коровой, профилактику паротита - живой паротитной вакцинами, или трехкомпонентной КПК (против кори, паротита, краснухи) согласно календарю прививок детям в возрасте 12-15 месяцев, ревакцинацию в возрасте 6 лет. Вакцина формирует длительный иммунитет.

Вакцины против кори, свинки (паротит) и краснухи, зарегистрированные в Украине: проверить!!!!!!

- 1) Приорикс ТЕТРА™ / PRIORIX TETRA™ Комбинированная вакцина для профилактики кори, эпидемического паротита, краснухи и ветряной оспы, живая аттенуированная (Бельгия);
- 2) Приорикс™ (PRIORIX™) Комбинированная вакцина для профилактики кори, эпидемического паротита и краснухи (фасовка в Украине);
- 3) Приорикс™ / PRIORIX™ Комбинированная вакцина для профилактики кори, эпидемического паротита и краснухи или in bulk (Бельгия);
- 4) ТРИВИВАК / TRIVIVAC Вакцина для профилактики кори, эпидемического паротита и краснухи живая аттенуированная или "in bulk" (Чехия);
- 5) Тримовакс / TRIMOVAX MERIEUX R.O.R. Вакцина для профилактики кори, эпидемического паротита и краснухи живая аттенуированная сухая (Франция);
- 6) Вакцина для профилактики краснухи живая, лиофилизированная "in bulk" (Хорватия);
- 7) Краслайф - вакцина для профилактики краснухи живая, лиофилизированная (Украина);
- 8) МОВИВАК Вакцина для профилактики кори живая аттенуированная или "in bulk" (Чехия);
- 9) ПАВИВАК / PAVIVAC Вакцина для профилактики эпидемического паротита живая аттенуированная или "in bulk" (Чехия).

Практическое занятие №17

Лабораторная диагностика герпетической инфекции, ветряной оспы и натуральной оспы. Лабораторная диагностика полиомиелита и заболеваний, которые вызывают вирусы Коксаки и ЕСНО.

Тема: "Герпесвирусы. Лабораторная диагностика герпесвирусных инфекций"

Актуальность темы:

Патогенные для человека вирусы, которые содержат дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), входят в состав 6 семейств: Adenoviridae, Herpesviridae, Parvoviridae, Poxsviridae, Herpadnaviridae, Papillomaviridae.

По сравнению с вирусами, содержащими рибонуклеиновую кислоту (РНК), они генетически более консервативны, то есть менее изменчивы, и нередко способны к длительной персистенции в организме хозяина. *Большинство ДНК-геномных вирусов репродуцируются в ядрах клеток.*

Конкретные цели:

1. Создать схему лабораторной диагностики герпесвирусной инфекций.
2. Изучить ЦПД, вызванную вирусами герпеса.
3. Изучить препараты, которые используют для диагностики и специфической профилактики герпесвирусных инфекций.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
ДНК-геномные вирусы	Вирусы, содержащие дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). Патогенные для человека вирусы, этого типа входят в состав 6 семейств: Adenoviridae, Herpesviridae, Parvoviridae, Poxsviridae, Herpadnaviridae, Papillomaviridae.
Герпесвирусы	Семейство Herpesviridae включает 3 подсемейства: Alpha-herpesvirinae, Beta-herpesvirinae, Gamma-herpesvirinae.

Теоретические вопросы к занятию:

- Общая характеристика ДНК-геномных вирусов, их классификация.
- Морфология и особенности репродукции герпесвирусов.
- Культивирование.
- Патогенез, клинические проявления и иммуногенез герпесвирусной инфекций.
- Принципы и методы лабораторной диагностики герпесвирусной инфекции.
- Принципы лечения и профилактики герпесвирусной инфекции.

Практические задания, выполняемые на занятии:

1. Создать схемы лабораторной диагностики герпеса.
2. Выявить результаты репродукции вирусов герпеса по цитопатогенному действию (ЦПД).
3. Ознакомиться с диагностическими, лечебно-профилактическими препаратами, которые используются при герпетической инфекции.

Содержание темы:

На практическом занятии студенты изучают классификацию вирусов герпеса, их морфологическую структуру, культивирование, особенности их репродукции;

роль вирусов герпеса в патологии человека, патогенез и иммуногенез заболеваний;

методы лабораторной диагностики герпесвирусной инфекции; принципы лечения, профилактики герпесвирусной инфекции; изучают симпластообразование, вызванное вирусами герпеса, создают схему лабораторной диагностики герпесвирусной инфекций, изучают препараты, которые используют для диагностики и специфической профилактики герпеса. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Герпес (с греческого – *ползучий*) – группа, широко распространенных, заболеваний, вызываемых вирусами отряда Herpesvirales, семейства Herpesviridae. Герпес клинически проявляется поражениями кожи, слизистых оболочек, нервной ткани, иногда внутренних органов. Клиническая картина развивается при состояниях нестабильного гомеостаза. В основном герпес – это дремлющая инфекция, характерна персистенция (**скрытое или латентное вирусоносительство**).

Рекомендации по оформлению протокола

Семейство Herpesviridae включает три подсемейства, отличающиеся по структуре генома, тканевому тропизму, цитопатологии и локализации латентной инфекции:

— подсемейство *Alphaherpesvirinae* — **вирусы** герпеса (ВПГ-1, ВПГ-2, VZV): для этой группы характерен быстрый рост. **Вирусы** размножаются в эпителиальных клетках, вызывая цитолитическое действие. В нейронах вызывают латентную, персистирующую инфекцию;

— подсемейство *Betaherpesvirinae* — **вирусы** герпеса (ЦМВ, ГВЧ-6, ГВЧ-7): для этой группы характерен медленный рост (латентная инфекция) в клетках эпителия слюнных желез, в glandaх, почках, лимфоцитах. Вирусы оказывают цитомегалическое действие (ЦМВ) и лимфопролиферативное действие;

— подсемейство *Gammaherpesvirinae* — вирусы (ВЭБ) растут в лимфобластоидных клетках, оказывают лимфопролиферативное действие. Вызывают латентную инфекцию в лимфоидной ткани, лимфоцитах, эпителиальных клетках рта и **глотки**, слюнных желез. ВЭБ вызывает размножение В-лимфоцитов и персистирует в них.

Классификация семейства *Herpesviridae*

Под-семейства	Род	Название вируса	Латентная инфекция	Патология
Alpha - herpesvirinae	Simplex - virus	Вирус простого герпеса тип 1 Herpes simplex virus тип 1	В нейронах	Лабильный герпес, энцефалит, поражение глаз
		Вирус простого герпеса тип 2 Herpes simplex virus тип 2		Генитальный герпес, менингоэнцефалит, рак шейки матки
	Varicello - virus	Вирус ветряной оспы – опоясывающего герпеса Varicella-zoster virus		Ветряная оспа, опоясывающий герпес (лишай)
Beta - herpesvirinae	Cytomegalo - virus	Цитомегаловирус	В моноцитах, лимфоцитах	Цитомегалия, рак простаты
	Roseolo - virus	Вирус лимфотропного герпеса 6	В Т-клетках и ?	Внезапная экзантема, рассеянный склероз -?, синдром хронической усталости, синдром Шегрена, поражение печени, почек и др.
		Вирус герпеса человека 7		

Gamma - herpesvirinae	Lympho - cryptovirus	Вирус Эпштейна-Барр	В лимф, ткани, В-клетках	Инфекционный мононуклеоз, лимфома Беркитта, назофарингиальная карцинома, ворсистая лейкоплакия языка
	Rhadinovirus	Вирус герпеса человека 8	В лимф, ткани	Саркома Капоши, первичная лимфома, болезнь Кацлемана

Основные свойства вирусов герпеса.

1. Икосаэдральная форма нуклеокапсида;
2. Большой размер – 150-250 нм; сложные (имеют суперкапсид);
3. ДНК линейная, 80 генов; молекулярная масса 54-94 млн. дальтон;
4. Капсид состоит из 162 капсомеров: 150 гексона; 12 пентонов на вершинах;
5. Тегумент - пространство между суперкапсидом и нуклеокапсидом содержит вирусные белки и ферменты, необходимые для его репликации;
6. Склонен к длительной персистенции в нервной ткани.

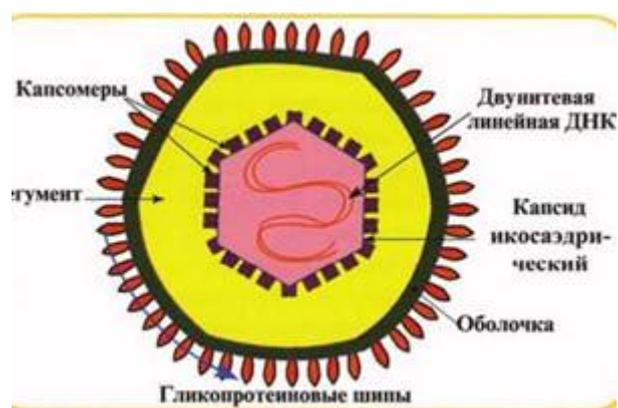


Рис. 4.26. Схема строения герпесвируса

Механизм размножения вируса герпеса в клетке (схема)

Основной чертой вирусов является то, что они могут размножаться, только паразитируя в клетках зараженного организма. Все вирусы, и герпесвирусы в том числе, не обладают собственным аппаратом для синтеза органических молекул, поэтому для самовоспроизведения они используют ресурсы клетки хозяина.

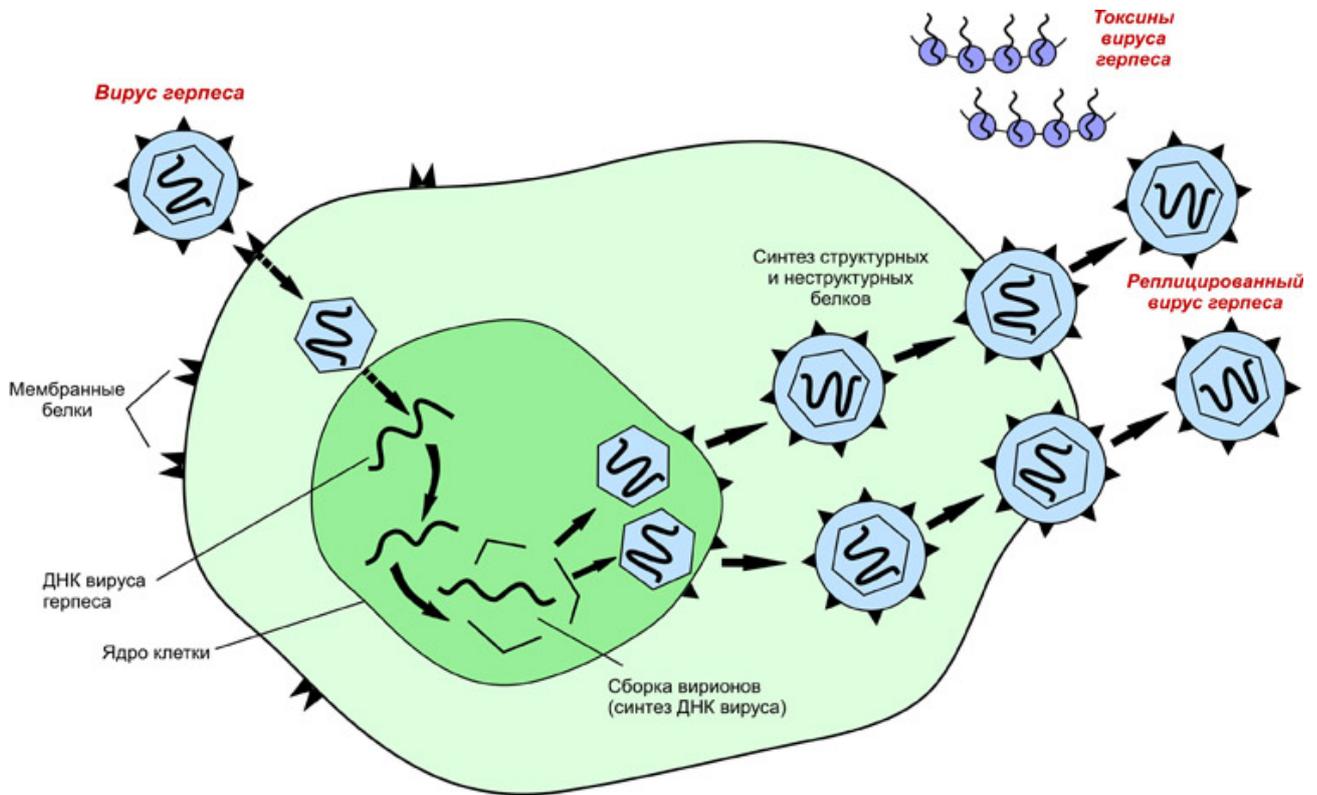


Рис 1. Механизм размножения вируса герпеса

Проникновение вируса герпеса в клетку, происходит путем взаимодействия вируса с рецепторами на мембране клетки (см рис.1). Соединяясь с рецептором, вирус герпеса теряет часть своих оболочек, «раздевается» и уже в таком виде движется в клетке, цель его передвижения — ядро клетки. На мембране ядра герпесвирус полностью «раздевается», оставляя снаружи ядра еще одну оболочку. В ядре происходит собственно размножение вируса — репликация ДНК. Вирус как бы заставляет клетку хозяина работать на себя, т.е. участвовать в образовании новых вирусов. Одна клетка дает несколько миллионов вирусов. После сборки новых ДНК происходит синтез оболочек вируса — тегмента и суперкапсида. Для их построения вирус использует мембрану ядра пораженной клетки, нарушая ее целостность. Из — за повреждений клетка наполняется жидкостью и вскоре гибнет.

ВПГ-1, вирус простого герпеса 1 типа.

Заражение ВПГ-1 обычно происходит контактным путем, например, при поцелуях или попадании каплей инфицированной слюны. Первичное заражение, как правило, бывает в раннем детстве от 6 мес до 2 лет (в первые 6 месяцев новорожденные защищены материнскими антителами) и протекает либо бессимптомно, либо вызывая стоматит или лабиальный герпес, с характерными высыпаниями во рту и на губах. После выздоровления, т.е. исчезновения симптомов заболевания, вирус не покидает организм. Через нервные окончания он проникает в ближайшие нервные сплетения — ганглии тройничного нерва, где и находит постоянное убежище. В нервных клетках вирус не размножается. Отсюда он периодически мигрирует на периферию, бессимптомно выделяясь в слюну, либо повреждая клетки кожи и слизистой, вызывая рецидив заболевания. К факторам,

способствующим реактивации вируса, относят переохлаждение, стресс, солнечный загар, инфекции, менструации.

В типичных случаях возникают высыпания из нескольких сгруппированных пузырьков (везикул) размером 1,5 — 2 мм на фоне покраснения и отека кожи. Этому предшествуют жжение, покалывание, зуд — результат прямого вирусного поражения нервов и/или воспалительной реакции вокруг нервной ткани. Затем пузырьки лопаются, образуя болезненные язвочки, которые бесследно заживают — эпителизируются. Нередко высыпания возникают на одном и том же месте. Это отражает «привязку» вирусной инфекции к определенным нервам. Полное исчезновение проявлений на коже происходит за 10-14 дней.

ВПГ-2, вирус простого герпеса 2 типа.

Этот тип вируса простого герпеса еще называют генитальным, поскольку он чаще всего вызывает поражение генитальной сферы. Первичное заражение происходит по достижении половой зрелости, при половых контактах. Подобно ВПГ-1, вирус простого герпеса 2 типа обычно не вызывает видимых проявлений, а сразу же транспортируется в ближайшие нервные сплетения, которыми становятся крестцовые ганглии спинного мозга, расположенные в поясничном отделе позвоночника. Лишь у 1-15% инфицированных первичное заражение может протекать с характерными проявлениями, которые развиваются при каждом последующем рецидиве заболевания. На слизистой оболочке и коже полового члена, у мужчин, и на вульве, влагалище и шейке матки у женщин развиваются отечность и покраснение. Там же появляются характерные пузырьки — везикулы. Они болезненны, сопровождаются жжением, саднением, болезненностью в месте поражения. Может повышаться температура тела до 38°C, увеличиваться паховые лимфоузлы. Значительное количество вируса в жидкости пузырьков (1 — 10 млн. в 1 мл) определяет высокую заразность больного. Рецидивы наблюдаются у 50-75% больных, продолжаются 2-3 недели и могут повторяться от 7 до 20 раз в год. Все это делает генитальный герпес одним из самых распространенных заболеваний, передающихся половым путем. У женщин бессимптомное течение цервикального (с поражением цервикального канала шейки матки) бывает в 40-75% случаев.

Цитомегаловирус (ЦМВ, вирус цитомегалии)

Цитомегаловирус был открыт в 1956 году, и в настоящее время еще не до конца изучен. Характерная особенность этого герпесвируса — способность образовывать клетки больших размеров (25-40 мкм; от греч. *meGas* — гигантский) с крупными внутриядерными включениями. Такого рода клетки образно сравнивают с **совиным глазом**.

Считается, что к пятидесятилетнему возрасту инфицировано 75%, а по некоторым данным почти 100% людей.

Стоит отметить, что этот вирус не очень заразен. Для заражения обычно требуются длительное, тесное общение или многократные контакты. Чаще всего заражение происходит в период новорожденности: при прохождении через родовый канал, при грудном вскармливании или через слюну, к концу 1 года жизни 5-10% детей имеют антитела к вирусу цитомегалии. В дальнейшем главным источником вируса служит слюна, но так как он содержится и в других жидкостях (моча, цервикальный и вагинальный секреты, сперма, кровь, пищеварительные секреты), пути заражения могут быть разными: воздушно-капельный, контактный, половой,

парентеральный. С развитием трансплантологии стало реальным заражение ЦМВ при пересадке органов, особенно почек.

Заболевания, вызываемые цитомегаловирусом

Цитомегаловирус вызывает разнообразные поражения, выраженность которых зависит от состояния иммунитета больного. Серьезные поражения отмечаются в двух случаях:

1. При заражении плода во время беременности. Внутриутробное инфицирование обычно проходит незаметно и ничем не обнаруживается при рождении. Но в 5% случаев (чаще при заражении в двух первых триместрах беременности) развивается цитомегалическая болезнь с поражением внутренних органов, центральной нервной системы, отставанием в умственном развитии, тугоухостью. В 20-30% случаев ребенок погибает. Врожденная цитомегаловирусная инфекция наблюдается почти исключительно у детей, матери которых во время беременности впервые заражаются цитомегаловирусом. Однако, проблемы нередко возникают и у беременных с активацией латентной ЦМВ-инфекции с развитием вирусемии (выход вируса в кровь) с последующим заражением плода. ЦМВ — одна из наиболее частых причин невынашивания беременности.

2. У лиц с иммунодефицитом (ВИЧ-инфицированные, химиотерапия по поводу злокачественных новообразований, иммуносупрессивная терапия при трансплантации внутренних органов) цитомегаловирус вызывает тяжелые заболевания (поражение глаз, легких, пищеварительной системы и головного мозга), которые могут приводить к смерти.

У людей с нормальным иммунитетом заражение цитомегаловирусом в большинстве случаев протекает бессимптомно.

Иногда у лиц с нормальным иммунитетом этот вирус вызывает так называемый мононуклеозоподобный синдром. Этот синдром возникает спустя 20-60 сут после заражения и длится 2-6 нед. Протекает он с высокой температурой, ознобом, утомляемостью, недомоганием и головной болью. В большинстве случаев мононуклеозоподобный синдром заканчивается полным выздоровлением.

Схема лабораторной диагностики герпеса.

Вирусосодержащий материал

I. Микроскопия

а) Выявление внутриядерных включений (тельца Каудри) в мазках-отпечатках;

б) Выявление специфического антигена методами прямой и непрямой иммунофлюоресценции.

II. Выделение вируса

↓	↓	↓
В культуре клеток (по ЦПД)	Куриные эмбрионы (появление бляшек на ХАО)	На лабораторных животных
↓	↓	↓

Идентификация выделенного вируса

↓
РИФ

↓
РН

↓
↓
Диагноз: герпетическая инфекция.

III. Серологическая диагностика: выявление нарастания титра антител в РЗК, РПГА, РТГА, РН.

Препараты для лечения и профилактики герпеса:

- модифицированные нуклеозиды, подавляющие репликацию вируса (ацикловир), индукторы интерферона;
- γ – глобулины против вируса ветряной оспы;
- иммуномодуляторы (левамизол).

Вакцины:

- инактивированная вакцина из штаммов вируса герпеса 1 и 2-го типов;
- живая аттенуированная вакцина против цитомегаловируса человека.

Задание 2. Изучить изменения в клетках, возникшие вследствие размножения вирусов герпеса. Зарисовать в протокол рисунки.



Симпластообразование,
вызванное герпес - вирусами

Вопросы для самоконтроля

- Общая характеристика ДНК-геномных вирусов, семейства Herpesviridae, классификация.
- Морфология и особенности репродукции герпесвирусов в клетке.
- Культивирование. Цитопатическое и цитотоксическое действие.
- Патогенез, клинические проявления и иммуногенез герпесвирусной инфекции.
- Принципы и методы лабораторной диагностики герпесвирусной инфекции.
- Принципы лечения и профилактики герпесвирусной инфекции.

На сегодняшний день известно 8 видов вирусов семейства герпеса, вызывающих заболевания исключительно у человека (табл. 1):

Таблица 1. Классификация герпесвирусов человека и основные клинические формы вызванных ими инфекций

Подсемейство	Род	Вирус	Основные клинические формы
α-Герпесвирусы (<i>Alphaherpesvirinae</i>)	Вирусы простого герпеса (<i>Simplexvirus</i>)	Вирус простого герпеса 1-го типа (HSV-1)	Герпес слизистой оболочки и кожи, кератоконъюнктивит, гепатит, энцефалит и другие неврологические осложнения
		Вирус простого герпеса 2-го типа (HSV-2)	Генитальный герпес, герпес новорожденных, диссеминированный герпес

	Вирусы ветряной оспы/опоясывающего герпеса (<i>Varicellovirus</i>)	Вирус ветряной оспы (VZV, или HHV-3)	Ветряная оспа, диссеминированная ветряная оспа, опоясывающий лишай, неврологические осложнения, гигантоклеточная пневмония
β-Герпесвирусы (<i>Betaherpesvirinae</i>)	Цитомегаловирус (<i>Cytomegalovirus</i>)	Цитомегаловирус (CMV, или HHV-5)	Врожденные аномалии плода, цитомегалия при иммунодефиците, мононуклеозоподобное заболевание
	Вирусы, образующие розеолы (<i>Roseolovirus</i>)	Вирус герпеса человека 6А типа (HHV-6А)	Системные болезни при синдроме приобретенного иммунного дефицита (СПИД), височная медианная эпилепсия, рассеянный склероз, лимфопролиферативные злокачественные новообразования
		Вирус герпеса человека 6В типа (HHV-6В)	Внезапная экзантема, фебрильные судороги, мононуклеозоподобный синдром, интерстициальный пневмонит, лимбический энцефалит, а также системные болезни после трансплантации органов
		Вирус герпеса человека 7-го типа (HHV-7)	Синдром хронической усталости, неврологические осложнения, лимфопролиферативные новообразования
γ-Герпесвирусы (<i>Gammaherpesvirinae</i>)	Лимфотропные вирусы (<i>Lymphocryptovirus</i>)	Вирус Эпштейна — Барр (EBV, или HHV-4)	Инфекционный мононуклеоз, хронический мононуклеоз, лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома, В-клеточная лимфома, лимфопролиферативные заболевания
	Вирусы саркомы Капоши (<i>Rhadinovirus</i>)	Вирус герпеса человека 8 типа (HHV-8)	Саркома Капоши, болезнь Кацлемана, лимфомы серозных оболочек

- 1) вирус простого герпеса 1-го типа, или вирус герпеса человека 1-го типа (*англ.*: herpes simplex virus type 1 — HSV-1; human herpes virus type 1 — HHV-1);
- 2) вирус простого герпеса 2-го типа (вирус генитального герпеса, или вирус герпеса человека 2) (HSV-2, или HHV-2);
- 3) вирус ветряной оспы/опоясывающего герпеса, или вирус герпеса человека 3-го типа (*varicella-zoster virus* — VZV, или HHV-3);
- 4) вирус Эпштейна — Барр, или вирус герпеса человека 4-го типа (Epstein-Barr virus — EBV, или HHV-4);
- 5) цитомегаловирус, или вирус герпеса человека 5-го типа (*cytomegalovirus* — CMV, или HHV-5);
- 6) вирус герпеса человека 6-го типа (HHV-6);
- 7) вирус герпеса человека 7-го типа (HHV-7);
- 8) вирус герпеса человека 8-го типа, или человеческий вирус саркомы Капоши (HHV-8, или *human Kaposi's sarcoma virus* — HKSv).

В табл. 2 систематизированы данные о применении различных специфических противовирусных препаратов при нейротропных герпесвирусных инфекциях.

Таблица 2. Лекарственные средства, применяемые при нейротропных герпесвирусных инфекциях

Препарат	Форма	Схема дозирования	Показания	Побочные эффекты
Ацикловир	Для в/в, перорального и местного применения, а также для использования в офтальмологии	По 10 мг/кг массы тела 3 раза в сутки ежедневно на протяжении 10–14 дней	Препарат первой линии при лечении герпесвирусного энцефалита и опоясывающего герпеса	Нефротоксичность, нейротоксичность, флебит, везикулярные высыпания, повышение концентрации трансаминаз
Фоскарнет	Для в/в и перорального применения	По 40 мг/кг 2–3 раза в сутки на протяжении 2–3 нед	Герпетический энцефалит, резистентный к ацикловиру	Нефротоксичность, электролитные нарушения (гипокалиемия), изъязвления полового члена, судороги
Валацикловир	Для перорального применения	По 1000 мг каждые 8 ч в течение 7 дней	Опоясывающий герпес	Сходны с таковыми у ацикловира
Фамцикловир	Для перорального применения	По 500 мг каждые 8 ч на протяжении 7 дней	Опоясывающий герпес	Повышенная чувствительность
Бривудин	Для перорального и местного применения	125 мг 1 раз в сутки в течение 7 дней	Опоясывающий герпес	Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, повышенная чувствительность, протеинурия, глюкозурия

Тема: "Пикорнавирусы. Лабораторная диагностика полиомиелита и заболеваний, которые вызывают вирусы Коксаки и ЕСНО.

Актуальность темы:

Семейство пикорнавирусов является типичным представителем РНК-содержащих простых икосаэдрических вирусов. Этим вирусам присуща высокая устойчивость к физико-химическим факторам.

Пикорнавирусы имеют широкий круг хозяев, вызывают разнообразную патологию и широко распространены в окружающей среде.

Основным родом этого семейства с патогенным потенциалом для человека является род энтеровирусов. К этому роду принадлежат вирусы полиомиелита, Коксаки и ЕСНО-инфекций.

Врачи должны знать биологические свойства энтеровирусов, патогенез, иммуногенез и клинические проявления инфекций, лабораторные методы диагностики, принципы лечения и специфической профилактики инфекций. Все это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

- **Конкретные цели:**

- Анализировать физико-химические и биологические свойства семейства пикорнавирусов.
- Создать схему лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций.
- Определить путем сравнения двух пробирочных препаратов культур клеток под номерами, в какой из них представлен неизмененный монослой, а в каком – цитопатическое действие по типу полной дегенерации, вызванное вирусом полиомиелита.
- Осуществить учет реакции связывания комплемента, поставленной с целью серологической диагностики полиомиелита.
- Осуществить учет реакции вирусной нейтрализации, поставленной с целью серологической идентификации энтеровируса, выделенного от больного ребенка с подозрением на полиомиелит.
- Изучить препараты, которые используются для диагностики, специфической профилактики и терапии энтеровирусных инфекций.
- Изучить морфологию и антигенные свойства вирусов Коксаки.
- Вивчители методы лабораторной диагностики заболеваний, вызванных вирусами Коксаки.
- Вивчители морфологию и антигенные свойства вирусов ЕСНО.
- Ознакомиться с основными клиническими формами заболеваний, вызванных ЕСНО-вирусами.
- Вивчители методы лабораторной диагностики заболеваний, вызванных ЕСНО-вирусами.
- Ознакомиться со средствами специфической и неспецифической профилактики ЕСНО-инфекций.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Пикорнавирус	Мелкие (24-30 нм в диаметре), простые икосаэдрические РНК-геномные вирусы, устойчивые к действию физико-химических факторов. Многие представители этого семейства высокопатогенны для человека. По современной классификации представлены 9 родами.
Энтеровирусы	Типичный род семейства пикорнавирусов, которому присущие тропность к энтероцитам и клеткам нервной системы, устойчивость в широком диапазоне рН (от 2,0 до 10,0) катионная стабилизация к тепловой инаktivации ионами Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} .
Полиовирус	Вид энтеровирусов человека, существующий в виде трех серотипов. Инфицируют клетку, связываясь со специфическими рецепторами PVR : CD 155.
Вакцина Солка	Инаktivированная полиовирусная вакцина. Вводится парентерально. Не создает местный иммунитет.
Вакцина Сэбина	Живая полиомиелитная вакцина, из аттенуированных штаммов трех серотипов полиовирусов. Вводится перорально. Создает общий и местный иммунитет.

Вирусы Коксаки	Энтеровирусы, выделенные в городке Коксаки штата Нью-Йорк (США), для которых присущ полиорганый тропизм. Разделяются на группы А и В по антигенному строению, цитопатическому действию на культуры клеток и формам паралича у новорожденных мышей. Известно 23 серотипа вирусов Коксаки А и 6 - Коксаки В
Вирусы ЕСНО	ЕСНО - сокращенное название, происходящее от английских слов: enteric - кишечные, cytopatogenic - цитопатогенные, human - человеческие, orphan - "сиротские". Выделено 28 серотипов.

Вирусы полиомиелита

Семейство	Picornaviridae	
Морфология	Тип НК	Однонитевая РНК
	Форма	Многогранник
	Уровень сложности строения	Простой
Антигенное строение	Вирус полиомиелита – серовары I, II, III	
Методы культивирования	Культура клеток фибробластов, HeLa	
Резистентность	Стойкие к детергентам, спиртам Чувствительные к альдегидам, соединениям хлора, фенолу, УФО, высушиванию	
Источник инфекции	Больной человек, носитель	
Механизм и путь передачи заболевания	Фекально-оральный механизм Алиментарный путь	
Органотропность	Энтероциты, лимфоидный аппарат тонкого кишечника, мотонейроны головного и спинного мозга	
Иммунитет	Типоспецифический	
Методы лабораторной диагностики	Вирусологический Серологический РИФ	
Специфическая профилактика	Полиомиелита: Живая вакцина Сэбина Инактивированная вакцина Солка	
Терапия	Интерферон, иммуноглобулин	

Специфическая профилактика и лечение.

Эпидемии полиомиелита охватывали в 40-50-х годах тысячи и десятки тысяч человек, из которых 10% умирали и примерно 40% становились инвалидами. Массовое применение вакцины против полиомиелита привело к резкому снижению заболеваемости в мире, в том числе, и в нашей стране. Разработанная Дж. Солком (1953) инактивированная вакцина против полиомиелиту не предотвратила циркуляции

полиовирусов среди населения, поскольку не обеспечивала местную резистентность пищеварительного тракта. А. Сэбин (1956) получил аттенуированные штаммы вируса полиомиелита трех типов и предложил использовать их как живую вакцину. В 1958 г. отечественные вирусологи А. А. Смородинцев и М. П. Чумаков разработали пероральную живую культуральную вакцину из штаммов Сэбина (выпускается в жидком виде), которую используют для прививок детям с трехмесячного возраста. Вакцина создает устойчивый гуморальный и местный иммунитет.

Лечение полиомиелита симптоматическое. Применение гомологического иммуноглобулина для предупреждения развития паралитических форм весьма ограничено.

Вакцины против полиомиелита

1) Вакцина для профилактики полиомиелита 1, 2, 3 типов трехвалентная живая жидкая пероральная (Россия)

2) Вакцина полиомиелитная (трехвалентная, инактивированная) ИПВ in bulk / Poliomyelitis vaccine (trivalent, inactivated) IPV in bulk (Нидерланды)

3) Вакцина полиомиелитная (трехвалентная, инактивированная) ИПВ in bulk / Poliomyelitis vaccine (trivalent, inactivated) IPV in bulk (Польша)

4) Имовакс ПОЛИО / IMOVAX POLIO Вакцина для профилактики полиомиелита инактивированная жидкая (Франция);

5) Имовакс ПОЛИО / IMOVAX POLIO (IPV) in bulk Вакцина для профилактики полиомиелита инактивированная жидкая in bulk (Франция);

6) ПОЛИОРИКС™ / POLIORIX™ Вакцина для профилактики полиомиелита инактивированная (Бельгия)

7) ПРОФПОЛИН™ / PROFPOLIN™ вакцина для профилактики полиомиелита (трехвалентная, инактивированная) (Украина)

Теоретические вопросы к занятию:

- Общая характеристика семейства пикорнавирусов, классификация.
- Строение и химический состав энтеровирусов.
- Чувствительность энтеровирусов к физическим и химическим факторам.
- Антигенная структура энтеровирусов.
- Культивирование и особенности репродукции в чувствительных клетках.
- Патогенез, клинические проявления и иммуногенез полиомиелита, Коксаки-вирусной и ЕСНО-вирусной инфекции.

- Принципы и методы лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций.

- Принципы специфической профилактики энтеровирусных инфекций. Сравнение живой и инактивированной полиомиелитной вакцин.

Практические задания, выполняемые на занятии:

- Создать схему лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций.
- Осуществить учет результатов серологической и вирусологической диагностики полиомиелита (демонстрация).

- Изучить препараты, которые используют для диагностики, специфической профилактики и терапии энтеровирусных инфекций.

Содержание темы:

На практическом занятии студенты изучают биологические свойства семейства пикорнавирусов в целом, рода энтеровирусов и отдельных его представителей (вирусов полиомиелита, Коксаки и ЕСНО). Под руководством преподавателя создают схему диагностики заболеваний, вызванных энтеровирусами. На демонстрационных препаратах изучают цитопатическое действие вирусов полиомиелита на культуру клеток и осуществляют серологическую идентификацию энтеровируса, выделенного от больного ребенка с подозрением на полиомиелит. При этом знакомятся с дифференциацией "диких" и аттенуированных штаммов полиовирусов, которую можно осуществить с помощью ПЦР, ИФА, РН с моноклональными антителами.

Для полиовирусов I типа используют бентонитовый тест (вирулентный полиовирус имеет характеристику Абент⁻, а авирулентные Абент⁺).

Осуществляют учет реакции связывания комплемента, поставленной с целью серологической диагностики полиомиелита.

Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

Вирусы Коксаки, ЕСНО и энтеровирусы типов 68-71 вирусы Коксаки выделены в 1948 г. в США в городке Коксаки из испражнений больных с полиомиелитоподобными заболеваниями. Вирусы Коксаки по степени патогенности для новорожденных мышей разделены на 2 группы - Коксаки А (поражают скелетную мускулатуру с развитием вялых параличей) и Коксаки В (поражают ЦНС с развитием спастических параличей; вызывают гибель мышей). Группа А представлена 23 серотипами, группа В – 6 серотипами, отличающиеся по антигенным свойствам. Вирусы обладают гемагглютинирующей активностью.

Вирусы ЕСНО получили название по начальным буквам слов: enteric cytopathogenic human orphan viruses (дословно: кишечные цитопатогенные человеческие вирусы-сиротки). Вирусы выделены в 1951-1953 гг. от больных с заболеванием, напоминающим полиомиелит. В отличие от вирусов полиомиелита и Коксаки вирусы ЕСНО являются непатогенными для всех видов лабораторных животных. Известно более 30 серотипов вирусов ЕСНО, отличающиеся по антигенным свойствам. Многие серотипы обладают гемагглютинирующими свойствами. Энтеровирусы серотипов 68-71 выделены в 70-х годах. Наибольшее значение в патологии человека имеют вирус типа 70 (выделен во время пандемии острого геморрагического конъюнктивита) и вирус типа 71 (выделен во время эпидемии от больных менингитом и энцефалитом). По биологическим свойствам эти вирусы занимают промежуточное положение среди других энтеровирусов.

Лабораторная диагностика.

Исследуемым материалом служат фекалии, носоглоточное смыв кровь, спинномозговая жидкость. Вирусы выделяют в культуре клеток и на новорожденных мышцах. Выделенный вирус идентифицируют с помощью РН на соответствующих биологических объектах, а также РТГА (для энтеровирусов, обладающих гемагглютинирующей активностью). Серодиагностика такая же, как при полиомиелите.

Специфическая профилактика и лечение.

Отечественными учеными разработана инактивированная вакцина против энтеровируса серотипа 71. Относительно других энтеровирусов вакцинопрофилактика отсутствует. Лечение симптоматическое.

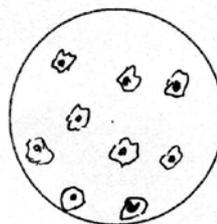
Рекомендации по оформлению протокола.

Задание 1. Под руководством преподавателя студенты составляют схему лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций и зарисовывают ее в протокол.

Задание 2. Изучить на демонстрационных препаратах неизмененную культуру клеток (контроль) и ЦПД вируса полиомиелита по типу полной дегенерации. Микроскопическую картину зарисовать в протокол.



Неизмененный монослой



ЦПД вируса полиомиелита

Дифференциация энтеровирусов по ЦПД

Вирус	ЦПД
Полиовирус	+
Коксаки А	±
Коксаки В	+
ЕСНО	+

Задание 3. Провести учет реакции вируснейтрализации, поставленной с целью серологической идентификации вируса, выделенного от больного ребенка с подозрением на полиомиелит (демонстрация).

Задание 4. Осуществить учет реакции связывания комплемента, поставленной с целью серологической диагностики полиомиелита.

Задание 5. Изучить препараты, которые используются для диагностики и специфической профилактики энтеровирусных инфекций.

Результаты выполнения всех работ записываются в протокол.

Энтеровирусы, вирусы гепатитов А и Е. Ротавирусы.

Большая часть острых кишечных инфекций (ОКИ) вызывается вирусами. Вирусов - возбудителей ОКИ известно более 120, среди них - энтеровирусы, ротавирусы, коронавирусы, калицивирусы, астровирусы и другие.

Семейство **Picornaviridae** объединяет четыре рода - **Enterovirus, Cardiovirus, Rhinovirus, Aphovirus**. Это мелкие “голые” вирусы с икосаэдральной (кубической) симметрией. Геном образован несегментированной позитивной РНК. Репликация РНК и сборка вируса осуществляется в цитоплазме, выход вируса сопровождается лизисом клетки. Репликация вРНК осуществляется по схеме: вРНК-> кРНК-> вРНК. Название семейства происходит от *рiсo* (лат. - маленький) и *RNA* (РНК), т.е. маленькие РНК-вирусы. Из рода афтовирuсов наибольшее значение имеет вирус ящура. Представители рода риновирусов (более 100 серотипов) - возбудители острых респираторных инфекций.

Род энтеровирусов.

Род объединяет несколько групп вирусов: полиовирусы (1 - 3 типов), вирусы Коксаки А (24 серовара), вирусы Коксаки В (6 сероваров) и ЕСНО (34 серовара), а

также неклассифицированные вирусы (вирусы 68 - 72). Энтеновирус 72 - возбудитель гепатита А.

Все энтеровирусы кислотоустойчивы (могут выживать в кислой среде желудка), отсутствие оболочки обуславливает их устойчивость к действию жировых растворителей и желчных кислот (особенно устойчивы полиовирусы). Патогенные виды поражают желудочно - кишечный тракт. Для них характерны: фекально - оральный механизм заражения, летне - осенняя сезонность, выделение вирусов из кишечника, носоглотки, ликвора и крови, обнаружение в сточных водах, широкое носительство, преимущественное поражение детского населения.

Полиовирусы.

Полиовирусы вызывают *полиомиелит* - острую инфекцию с поражением нейронов продолговатого мозга и передних рогов спинного мозга. Важнейшее биологическое свойство полиовирусов - тропизм к двигательным клеткам серого вещества спинного мозга (*polios* - серый, *myelitis* - воспаление спинного мозга).

Капсид вириона образован четырьмя белками, образующими внешнюю (VP1, VP2, VP3) и внутреннюю (VP4) поверхности капсида. Белки оболочки имеют значение в распознавании и прикреплению к клеточным рецепторам, высвобождении вирионной РНК внутри клетки, развитии параличей.

По антигенным свойствам полиовирусы подразделяют на три типа, наибольшей вирулентностью и эпидемической активностью обладают полиовирусы 1 типа.

Патогенез поражений. *Входными воротами* для полиовирусов являются слизистые глотки, желудка, тонкого кишечника. После размножения в эпителиальных клетках вирус проникает в регионарные лимфатические узлы, затем - в кровь (первичная вирусемия). Эти первые стадии характеризуют "малую болезнь", которая может протекать практически бессимптомно (легкое недомогание, кратковременное повышение температуры) и заканчиваться формированием постинфекционного иммунитета и выздоровлением, что и происходит в большинстве случаев.

Если полиовирус преодолевает гематоэнцефалитический барьер и поражает нейроны передних рогов спинного мозга, продолговатого мозга и варолиева моста, несущие рецепторы к полиовирусам, развивается "большая болезнь" - паралитические формы (спинальный полиомиелит обычно с асимметричными поражениями нижних конечностей, бульбарный полиомиелит в ряде случаев с поражениями центров, контролирующих дыхательные мышцы, а также сочетанные спинально - бульбарные поражения).

Лабораторная диагностика имеет особое значение, особенно при стертых формах, поскольку многие энтеро - и герпетовирусы способны вызывать схожие поражения. Поэтому исследования необходимо проводить одновременно на все эти группы вирусов.

1. *Вирусологическая диагностика* включает выделение вируса на различных культурах клеток или (в некоторых случаях - Коксаки А) на новорожденных белых мышках, с последующей идентификацией по цитопатическому эффекту, в РН, РТГА, РСК с эталонными сыворотками.

2. *Серологическая диагностика* осуществляется в различных реакциях (в настоящее время - ИФА), необходимо исследование в парных сыворотках, выявление специфических IgM - антител.

Иммунитет и специфическая профилактика.

Иммунитет к полиовирусам прочный, обусловленный вируснейтрализующими антителами и клетками иммунной памяти. Для специфической профилактики используют убитые (вакцина Солка) и живые (вакцина Сэбина) ослабленные вакцины (содержат аттенуированные штаммы полиовирусов 1, 2 и 3 типов). Существуют программы массовой иммунизации против полиомиелита и программы полной ликвидации этой инфекции.

На фоне резкого снижения и ликвидации полиомиелита наблюдаются полиомиелитоподобные заболевания, вызываемые преимущественно вирусами *Коксаки* и *ЕСНО*.

Вирусы Коксаки.

Они образуют группу, близкую к полиовирусам. Вирусы Коксаки групп А и В в отличие от полиовирусов патогенны для новорожденных мышей, отличаясь друг от друга характером вызываемых у них поражений (группа А - преимущественные поражения скелетной мускулатуры, группы В - преимущественные поражения центральной нервной системы).

Антигенная структура. Вирусы Коксаки не дают перекрестных серологических реакций с полиовирусами, группа А имеет 24 серовара, группа В - 6 сероваров. Серовары не содержат группоспецифического антигена, однако обладают некоторой перекрестной реактивностью. Наличие у возбудителей типоспецифических антигенов обуславливает синтез типоспецифических антител. Серовары Коксаки В и некоторые серовары Коксаки А обладают в отличие от полиовирусов гемагглютинирующими свойствами.

Клинические проявления.

Среди всех энтеровирусов вирусы Коксаки (особенно группы В) обладают наибольшей кардиотропностью, вызывая миокардиты. Наиболее часто они поражают детей, вызывают в большинстве случаев легкие формы преимущественно с "простудной" симптоматикой. Наряду с полиомиелитоподобными заболеваниями (вялыми параличами) и миокардитами, вирусы этой группы способны вызывать ОРЗ, гастроэнтериты, герпангины и пузырчатку полости рта и конечностей.

Лабораторная диагностика - как у всех энтеровирусов. Принадлежность к сероварам определяют в РСК или РН с типоспецифическими сыворотками.

Эффективных методов специфической профилактики и противовирусной терапии не разработано.

ЕСНО – **вирусы** получили свое название от слов *Enteric* (кишечные) *Cytopathogenic* (цитопатогенные) *Human* (человеческие) *Orphan* (сиротские) вирусы. Они были выделены из кишечника человека, по ряду признаков оказались схожими с полиовирусами и вирусами Коксаки, однако первоначально не были связаны с какими-либо заболеваниями (т.е. оказались "сиротскими").

Классификация и антигенная структура.

В настоящее время кишечная группа ЕСНО-вирусов насчитывает 34 серовара. Разделение основано на типоспецифичности антигенов вирусного капсида. Некоторые антигены обладают перекрестной реактивностью, 12 серотипов способны к гемагглютинации.

Патогенез заболеваний, вызываемых ЕСНО-вирусами сходен с патогенезом полиомиелита. Заражение происходит преимущественно фекально - оральным путем. Размножение вирусов происходит в эпителиальных клетках слизистых, а также в лимфоидной ткани. Способны вызывать "простудные заболевания" (по типу ОРВИ),

некоторые серотипы (11, 18 и особенно 19) - кишечные диспепсии, более редко - менингиты, восходящие параличи и энцефалиты, отдельные серотипы - гепатиты, конъюнктивиты, увеиты (серотипы 11 и 19).

Группа неклассифицированных энтеровирусов. Из этой группы наибольшее значение имеет *энтеровирус 72 - вирус гепатита А (возбудитель болезни Боткина) – HAV (hepatitis A virus).*

Вирусные гепатиты представляют большую разнородную по этиологии, но схожую по клиническим проявлениям группу тяжелых (по последствиям) заболеваний, широко распространенных в мире. Вирус гепатита А - энтеровирус 72, В - гепадновирус, С и G - тогавирусы рода Flavivirus, D - неклассифицированный вирус, Е - калицивирус. Из них вирусы гепатитов А и Е характеризуются преимущественно фекально - оральным механизмом передачи, В, С и G - парентеральным (гемоконтактным), D (дельта)- является дефектным вирусом - сателлитом вируса гепатита В, передаваемым парентерально и вертикально (от матери плоду).

Вирус гепатита А имеет “голый” капсид с кубическим типом симметрии - икосаэдр. Геном образует однонитевая молекула позитивной РНК. Белковая оболочка (капсид) содержит 4 структурных белка - VP1, VP2, VP3, VP4. HAV является одним из наиболее устойчивых во внешней среде вирусов.

Антигенная структура.

Вирус имеет один антигенный тип и содержит главный антиген (НА Ag), развитие иммунного ответа к которому обеспечивает прочный пожизненный иммунитет.

Патогенез поражений.

Вирус проникает в организм в результате реализации фекально - орального механизма заражения, реплицируется в эпителии слизистой тонкой кишки и регионарных лимфатических узлах, затем проникает в кровь (наибольшие титры вируса в крови - в конце инкубационного и в преджелтушный период), выделяется с фекалиями. Затем возбудитель проникает в печень и вызывает острый диффузный гепатит, связанный с поражением гепатоцитов (основной мишени для размножения и цитопатогенного действия вируса) и ретикуло - эндотелиальных элементов печени. Это сопровождается снижением барьерной и дезинтоксикационной функций печени, нарушениями белкового, углеводного и пигментного обмена, возрастанием уровня в сыворотке крови альдолазы и печеночных (разрушение гепатоцитов) аминотрансфераз (аланин - и аспартат - аминотрансфераз), билирубина.

Клинические особенности.

Наиболее типична острая желтушная циклическая форма, однако преобладают легкие безжелтушные и бессимптомные формы. Для этой инфекции характерно относительно легкое течение, практическое отсутствие вирусоносительства и хронических форм болезни.

Лабораторная диагностика

1. Определение желчных пигментов и аминотрансфераз в сыворотке крови.
2. ИФА для выявления антигенов вируса и IgM- антител к нему. Антигены HAV в фекалиях можно выявить только в конце инкубации до появления клинических проявлений. Наиболее надежный метод диагностики - обнаружение ранних антиHAV - IgM антител. Они выявляются практически у всех больных независимо от формы заболевания и свидетельствуют о наличии текущей или недавней инфекции.

Специфическая профилактика.

Используют инактивированные вакцины против вируса гепатита А отечественного (“Геп - А инвак”) и зарубежного (“Хаврикс 1400” фирмы “Смит Кляйн Бичем”) производства. Трехкратная (при рождении, в 1 и 6 месяцев) вакцинация формирует защитный иммунитет у 99% детей.

Вирус гепатита Е

Общая характеристика.

Гепатит Е - инфекция, имеющая эпидемиологическое сходство с гепатитом А, известная ранее как “гепатит ни -А, ни -В с фекально - оральным механизмом передачи”. Возбудитель - вирус гепатита Е (HEV) относится к семейству *калицивирусов*, однако в последние годы это ставится под сомнение. Он имеет сферическую форму, диаметр вириона около 30 нм, суперкапсида не имеет. Геном представлен однонитевой нефрагментированной позитивной РНК. Антигенного родства с НАV не имеет, отличается меньшей вирулентностью для человека. Представители семейства калицивирусов по ряду признаков близки пикорнавирусам. Свое название они получили от лат. *calix* - чаша за счет наличия чашеобразных углублений на поверхности капсида. Среди представителей семейства - возбудители гастроэнтеритов животных (например, вирус Норфолк), вирус гепатита Е.

Эпидемиология.

Вирус имеет фекально - оральный механизм распространения, реализуемый преимущественно при употреблении инфицированной воды. Широко распространен в странах с жарким климатом и плохим водоснабжением, при употреблении некачественной воды (из арыков, оросительных каналов, загрязнении грунтовыми водами и т.д.) происходит заражение. Вспышки наблюдают в Юго - Восточной Азии, Африке, Южной Америке. Инфекция распространена в Среднеазиатском регионе бывшего СССР. Особенность - высокая летальность HEV- инфекции у беременных во второй половине беременности.

Лабораторная диагностика.

Разработаны тест - системы ИФА и иммуноблота для выявления антител к HEV классов IgM и IgG, пригодные для диагностики в острой стадии болезни и в период реконвалесценции.

Профилактика ВГЕ - неспецифическая. Иммунитет - прочный, обусловлен вируснейтрализующими антителами и клетками памяти.

Ротавирусы.

В семейство реовирусов входят рода реовирусов, ротавирусов и орбивирусов. Название реовирусов происходит от *respiratory enteric orphan* - “reo”, т.е. респираторные кишечные вирусы. Эти вирусы имеют двунитевую фрагментированную РНК, окруженную капсидом с двуслойной оболочкой (наружный и внутренний капсид). Реовирусная инфекция характеризуется поражением респираторного и кишечного трактов. Основной путь передачи - воздушно - капельный, однако важное значение имеет и алиментарный, поскольку эти вирусы широко распространены не только у человека, но и у многих видов животных, люди могут получать эти вирусы алиментарным путем - с продуктами питания.

Ротавирусы свое название получили в связи со своеобразием морфологии вируса (лат. *rota* - *колесо*). Впервые ротавирусы выявлены у детей с острым гастроэнтеритом их эпителиальных клеток слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки. Вирионы при электронно - микроскопическом исследовании имеют вид колес диаметром 70 нм с круговым ободком по периферии и отходящими внутрь “спицами”.

Имеют наружный и внутренний капсид, внутри которого содержится двунитевая фрагментированная РНК. К ротавирусам человека серологически близки ротавирус телят (Небраски) и обезьян, которые легче культивировать в клеточных культурах и которые используют в качестве антигенных препаратов для серодиагностики ротавирусной инфекции у людей. Ротавирус человека - фекально - оральный вирус. Он вызывает гастроэнтериты у новорожденных (внутрибольничные вспышки), дошкольников и младших школьников. В мире ежегодно регистрируют до нескольких миллионов летальных исходов ротавирусного гастроэнтерита у детей. Наиболее опасны больные в первые 3-5 дней заболевания в связи с интенсивным выделением вируса с фекалиями. Лабораторная диагностика основана на выявлении антигена вируса в фекалиях (ИФА, реакция коагутинации, иммунофлюоресцентный анализ, РНК- зонды, иммунная электронная микроскопия), серологических методах (РСК, РТГА, ИФА), изоляции на культурах клеток.

Вопросы для самоконтроля.

- Какой тип нуклеиновой кислоты содержат пикорнавирусы?
- Какое строение имеет пикорнавирус?
- Каковы определяющие признаки рода энтеровирусов?
- Какие вирусы принадлежат к роду энтеровирусов?
- Каково антигенное строение энтеровирусов?
- Как можно культивировать энтеровирусы?
- Каковы этапы взаимодействия энтеровирусов с чувствительными клетками?
- Сколько существует серологических типов вирусов полиомиелита?
- Каков патогенез полиомиелита?
- Каковы методы лабораторной диагностики полиомиелита?
- Какие вакцины используют для профилактики полиомиелита? Каковы позитивные и негативные стороны живых и инактивированных вакцин?
- Каковы критерии дифференциации вирусов Коксаки А и вирусов Коксаки В?
- Как расшифровывается аббревиатура ЕСНО?

Практическое занятие №18

Лабораторная диагностика гепатитов А, В, С, Д, Е, F, G. Лабораторная диагностика бешенства и арбовирусных инфекций.

Тема: "Возбудители вирусных гепатитов. Лабораторная диагностика вирусных гепатитов"

Актуальность темы:

Вирусные гепатиты (ВГ) вызываются разными типами вирусов, с разными механизмами передачи инфекции и патогенезом. Объединяет эту группу заболеваний гепатотропность всех возбудителей и, как следствие, схожие основные клинические проявления (желтуха, интоксикация, гепатоспленомегалия).

За последние десятилетия отмечается резкий рост заболеваемости вирусными гепатитами, в частности, с парентеральным путем передачи. Считают, что около 1 миллиарда людей на планете заражены по крайней мере одним из вирусов, которые вызывают ВГ. Хотя ВГ и занимают по официальным данным 2 место после гриппа и других острых респираторных инфекций (ОРИ) по количеству больных, они значительно превосходят их по числу тяжелых форм, экономическим расходам, летальным последствиям. И это притом, что регистрируются далеко не все случаи ВГ - безжелтушные, стертые формы, часто проходят мимо внимания врача. Поэтому в действительности ВГ не уступает гриппу и другим ОРВИ по распространенности. За один день на земном шаре умирает от ВГ и их последствий столько же людей, сколько за год от СПИДа. Таким образом, борьба с ВГ является одной из первостепенных проблем мировой системы здравоохранения.

На данный момент установлена роль в патологии печени по меньшей мере 6 вирусов (А - Е и G). Термин "ВГГ" сейчас не употребляется, так как выделенные в ранних исследованиях «вирусы гепатита F» оказались обезьяньими флаовирусами и вирусом G. Обсуждается участие в человеческой патологии и возможная степень повреждения печени недавно открытыми вирусами TTV и SEN, а также некоторыми вирусами животных (пекинских уток, канадского лесного сурка и др.).

На занятии студентам предоставляется возможность ознакомиться с методами диагностики вирусных гепатитов, в частности, с постановкой ИФА. Уделяется внимание определению диагностических маркеров вирусных гепатитов.

Знание особенностей возбудителей вирусных гепатитов, умение выбирать адекватные методы лабораторной диагностики вирусных гепатитов и трактовать полученные результаты является необходимым для формирования у студентов представления о методах диагностики вирусных заболеваний.

Конкретные цели:

- Проанализировать биологические свойства возбудителей вирусных гепатитов.
- Объяснить роль возбудителей вирусных гепатитов в патологии человека.
- Трактовать методы диагностики вирусных гепатитов, делать выводы по результатам исследований.
- Изучить препараты, используемые для специфической профилактики вирусных гепатитов.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию:

Термин	Определение
Вирусные гепатиты	Группа заболеваний, вызванных разными типами вирусов, с неодинаковыми механизмами передачи инфекции и различным патогенезом, объединенных гепатотропностью возбудителей и, следовательно, сходными клиническими проявлениями (желтуха, интоксикация, гепатоспленомегалия).
Австралийский антиген	(Australia antigen) – старое название поверхностного антигена вируса гепатита В, существовавшее до идентификации вируса гепатита В и его антигенов. Термин возник в связи с выявлением

	этого антигена в сыворотках крови австралийских аборигенов. Впоследствии идентифицирован как антигенный компонент вируса гепатита В - HBsAg.
Диагностические маркеры	(маркеры инфицирования) - антигены, антитела и нуклеиновые кислоты вирусов, выявление которых позволяет установить этиологию вирусного гепатита и/или присутствие вируса, характеризовать ход инфекции, прогнозировать ее результат, оценить эффективность лечения, судить о предыдущей встрече с вирусом, вызвавшим гепатит, и поствакцинальный иммунитет.
Вирусная персистенция	Сохранение вируса в функционально активном состоянии в клетках организма или культурах клеток дольше сроков, присущих острой инфекции. Инфекции, обусловленные этим феноменом, называют персистентными вирусными инфекциями.
Быстрые иммунохроматографические методы определения HBsAg и анти-ВГС	Позволяют получить результат исследования в течение 5-15 минут без использования сложного лабораторного оборудования. Основой теста является нитроцеллюлозная мембрана, на поверхности которой сорбированы анти- HBs АГ антигены, которые кодируются РНК ВГС. После связывания с ними искомого HBsAg или анти-ВГС, последовательной промывки и добавления конъюгата (например: анти- HBs, меченого коллоидным золотом, или меченой ферментом антисыворотки преципитирующей IgG), на мембране происходит накопление красителя и образуются цветные полосы.
Группы риска	Часть населения, объединенная по принципу повышенной достоверности заражения тем или другим инфекционным заболеванием в результате более частых, более длительных или более тесных контактов с возбудителем.
Вирусы гепатитов	Вирусы, способные вызывать специфическое поражение печени - гепатиты. Они относятся к разным таксономическим группам и имеют различные биологические свойства. Объединяет их лишь способность вызывать гепатит у человека. К вирусам гепатитов относят: вирус гепатита А, вирус гепатита В, вирус гепатита С, вирус гепатита D или дельта-гепатита, вирус гепатита Е, и вирус гепатита G. Возможно существование других, пока что неидентифицированных, вирусов гепатита.

Теоретические вопросы к занятию:

- Облигатные и факультативные возбудители вирусных гепатитов, их свойства и классификация.
- Вирусный гепатит А. Этиология, эпидемиология, патогенез, клинические проявления. Характеристика методов лабораторной диагностики. Специфическая профилактика, постинфекционный и поствакцинальный иммунитет.
- Вирус гепатита В. Особенности строения. Характеристика антигенов. Репродукция.

- Эпидемиология, патогенез и клиника вирусного гепатита В. Постинфекционный иммунитет. Лабораторная диагностика. Динамика появления серологических маркеров гепатита В. Интерпретация серологических данных.
- Профилактика и лечение гепатита В.
- Вирусный гепатит С. Этиология, эпидемиология, патогенез, клинические проявления. Характеристика методов лабораторной диагностики. Специфическая профилактика, постинфекционный и поствакцинальный иммунитет.
- Вирусный гепатит D. Этиология, эпидемиология, патогенез, клинические проявления. Характеристика методов лабораторной диагностики. Специфическая профилактика, постинфекционный и поствакцинальный иммунитет.
- Вирусный гепатит E. Этиология, эпидемиология, патогенез, клинические проявления. Характеристика методов лабораторной диагностики.
- Возбудители вирусных гепатитов G, TTV, SenV.

Практические задания, выполняемые на занятии:

1. Изучить классификацию и дифференциальные свойства вирусов гепатитов.
2. Осуществить учет лабораторной диагностики гепатита В с помощью ИФА. Сделать вывод.
3. Ознакомиться с диагностическими тест-системами, лечебно-профилактическими препаратами, которые используются при гепатитах.

Содержание темы.

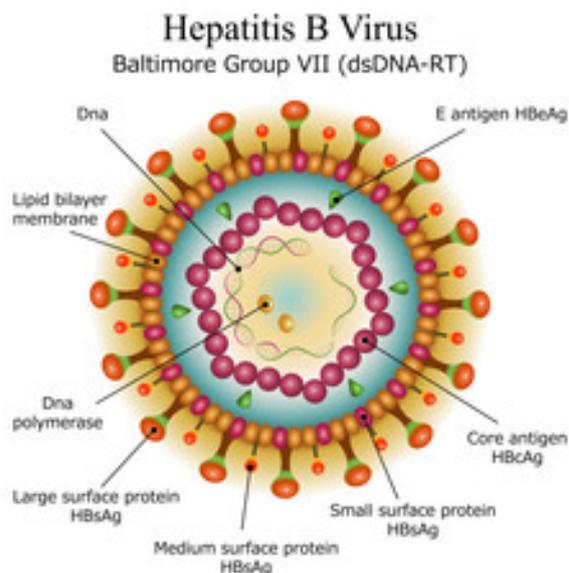
Классификация: Семейство пикорнавирусов, род гепа́товирuс, вирус гепатита А (эпидемический гепатит). Семейство гепа́днaвирuсов, род ортогепа́днaвирuс, вирус гепатита В (сывороточный гепатит). Семейство флави́вирuсов, род гепа́цивир uс, вирус гепатита С, вирус гепатита G. Семейство аде́новирuсов, род аде́новирuс, вирус гепатита F. Неклассифицированный вирус гепатита D; вирус гепатита E; ТТ-вирус; SEN-вирус. **По способу передачи различают** вирусы с преимущественно фекально-оральным механизмом передачи - вирусы гепатитов А и E (вызывают инфекционные гепатиты) и вирусы с преимущественно парентеральным механизмом передачи - вирусы гепатитов В, С, D, G (вызывают сывороточные гепатиты). **Течение заболевания** зависит от типа вируса и особенностей иммунного ответа инфицированного человека (острый, хронический с периодическими обострениями или медленно прогрессирующее течение, формирование носительства). **Принципы лабораторной диагностики инфекционных гепатитов:** Обнаружение вирусов или их антигенов в фекалиях больного (ИЭМ, ИФА, РИА, РИФ) и выявления вирус-специфических антител в парных сыворотках пациента: Ig M (в острой фазе) и Ig G (после перенесенного гепатита) с помощью РСК, РНГА, ИФА, РИА. **Принципы лабораторной диагностики сывороточных гепатитов:** выявление вирусных антигенов в крови (ИФА, РИА, РИФ) и выявления вирус-специфических антител в сыворотке пациента (РНГА, ИФА, РИА). Молекулярно-генетические методы в диагностике вирусных гепатитов: выявление вирусных нуклеиновых кислот в крови с помощью ПЦР.

Вирус гепатита А: простой, (+) РНК-геном однониточный, тип симметрии - кубический. Имеет рецепторы к энтероцитам тонкого кишечника, лимфатическому

аппарату кишечника, гепатоцитам; выделяют 1 тип вируса по НАV-Аг (нуклеокапсид). Чувствителен к воздействию УФ лучей, высоких температур, дезинфектантов; устойчив к низким температурам, действию эфира, спирта, детергентов, хорошо сохраняется во внешней среде (в воде). Культивируют в культуре гепатоцитов мышей, но ЦПД слабо выражено или отсутствует. **Источником инфекции** является больной человек или вирусоноситель; преимущественный путь передачи - водный; человек выделяет вирус последние 10-14 дней инкубационного периода. Стадии патогенеза - энтеральная фаза, фаза регионарного лимфаденита, фаза первичной генерализации инфекции (первичная вирусемия), гепатогенная фаза (паренхиматозная диффузия), фаза неустойчивой локализации и повторной вирусемии, фаза иммуногенеза и освобождение организма от возбудителя. Иммуниет длительный, напряженный. Специфическая профилактика - инактивированные вакцины (Хаврикс, Аваксим), нормальный человеческий иммуноглобулин для контактных лиц. Лечение: использование индукторов интерферона.

Вирус гепатита В (HBV) вызывает сывороточный гепатит, относится к семейству гепадновирусов - оболочечных ДНК – вирусов. Вирусные частицы размером 42 - 45 нм (частицы Дейна) имеют сложное строение и включают ДНК-геном (одна из нитей неполная, связанная с вирусной ДНК-полимеразой), имеют рецепторы к α -протеину мембраны гепатоцитов. Антигенная структура вируса – поверхностный HBsAg “австралийский”- гликопротеин и липид суперкапсида, сердцевинный или **коровский** HBcAg или coreAg- нуклеопротеин, который содержится в капсиде вирионов, HBeAg (антиген инфекционности, выявляемый в крови при активной репликации HBV) отщепляется от HBc-Ag при прохождении вируса через мембрану гепатоцита, наименее изученный HBxAg - регуляторный белок, участвует в опухолевой трансформации гепатоцитов (опухолевый антиген).

С учетом сложной антигенной структуры вируса гепатита В, в диагностике данной инфекции используют целый ряд маркеров инфицирования, в т.ч. антигены (HBs Ag, HBc Ag, HBe Ag) и соответствующие им антитела (анти - HBs, анти - HBc и анти - HBe).



Вирус чувствителен к альдегидам, детергентам, спирту, эфиру; устойчив к низким и высоким температурам, УФ лучам. ЦПД при культивировании слабо выражено.

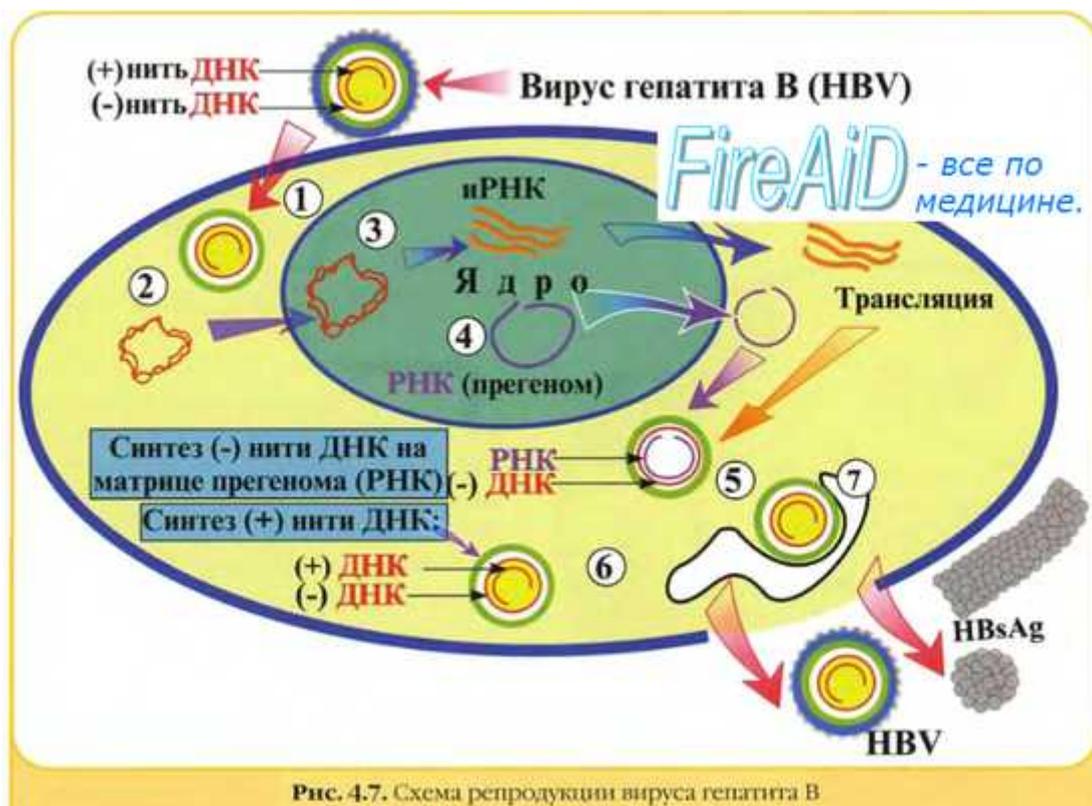


Рис. 4.7. Схема репродукции вируса гепатита В

Цикл репродукции HBV очень сложен и проходит через промежуточное звено - РНК (ДНК РНК-ДНК), т.е. с механизмом обратной транскрипции. При транскрипции вирусного генома в ядре гепатоцита клеточная ДНК - зависимая РНК - полимеразы синтезируют два типа мРНК - большего размера (прегеном) и меньшего размера (для синтеза вирусных белков). Прегеном и вирусная ДНК - полимеразы упаковываются в капсид и переносятся в цитоплазму. Под действием вирус - индуцированной обратной транскриптазы на матрице прегенома (РНК) синтезируется новая минус - нить ДНК. Вирионная ДНК - полимеразы на минус - цепи синтезируют плюс - цепь. Если вирусная двухцепочечная ДНК не вступает в дальнейшую репликацию, сформированный нуклеокапсид, проходя через мембрану клетки, покрывается суперкапсидом и отпочковывается от клетки.

Источником инфекции является больной человек и вирусоноситель; заражение происходит половым, парентеральным, трансплацентарным, трансплантационным путями; поражения гепатоцитов напрямую не связано с непосредственным действием вируса (цитопатического эффекта нет), а с иммунными (аутоагрессивными) реакциями хозяина, связанными с модификацией клеточных мембран вирусными белками. Аутоагрессия происходит под действием натуральных киллеров, Т-киллеров, антитело-опосредованного цитолиза, возможно развитие карциномы печени под влиянием HBx-антигена.

Постинфекционный иммунитет длительный, направлен против основного протективного HBs антигена, обусловлен вируснейтрализующими анти - HBs антителами. При этом, иммунитет при циклическом течении (выведение вируса) стерильный, пожизненный; при ациклическом течении (вирус интегрируется в геном гепатоцита и не выводится) нестерильный, имеет место репродукция вируса гепатита В.

Профилактика специфическая - плановая вакцинация рекомбинантными генно-инженерными вакцинами ("Энжерикс В", "Рекомбивакс В" и др.) (содержит

HBsAg) новорожденных с ревакцинацией в 2 мес. и 7-8 мес., введение специфического антиHBs γ -глобулина. Для экстренной профилактики контактным может применяться донорский иммуноглобулин, содержащий антитела к HBV. **Лечение** - противовирусные ХТС - ингибиторы ДНК-полимеразы, интерферон, его индукторы, специфический γ -глобулин.

Гепатит С. Вирус гепатита С (ВГС) относится к семейству Flaviviridae (флаовирусы), роду Heparvirus. Сложноорганизованный РНК-содержащий вирус. Вирион сферической формы, диаметр 55 -- 65 нм. Геном представлен однонитевой РНК и геномными ферментами, участвующими в репликации вируса. Имеет суперкапсид. Известно более 10 генотипов, наиболее патогенным является 1б.

В составе вирусной частицы присутствуют сердцевинный -- С-протеин и поверхностный -- суперкапсидный (Е1, Е2) гликопротеиновые антигены.

Гепатит D (дельта-инфекция). Вирус гепатита D (ВГD) впервые описан М.Ризетто в 1977 году в ядрах гепатоцитов больных хроническим вирусным гепатитом. Вирус не классифицирован. Вирус гепатита D - дельта-вирус (Hepatitis delta virus) является сателлитом вируса гепатита В и представляет собой дефектный вирус, не имеющий собственной оболочки. Вирион ВГD имеет сферическую форму, диаметром 35--37 нм., однонитевую РНК, покрытую внешней оболочкой и сердцевинный дельта-антиген (D-антиген). В качестве внешней оболочки вирус гепатита D использует HBs-антиген внешней оболочки вируса гепатита В. Вирус гепатита D не способен к самостоятельной репликации в организме хозяина, так как синтез белков его внешней оболочки обеспечивает вирус гепатита В. Таким образом, без возбудителя гепатита В дельта-инфекция не развивается. Возможно одновременное заражение вирусами гепатита В и гепатита D (коинфекция). В свободном виде вирус гепатита D в крови инфицированных не обнаруживается.

Присоединение дельта-инфекции у больных гепатитом В ведет к переходу острого гепатита в хронический, утяжеляет течение инфекции, приводя к развитию острой печеночной недостаточности и циррозу печени.

Рекомендации по оформлению протокола.

Характеристика вирусов гепатита

Характеристика вирусов	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV	HGV
Таксономическое положение вирусов	Семейство пикорнавирусов, род гепатовирус с		семейство Flaviviridae (флаовирусы), род Heparvirus.			
Тип нуклеиновой кислоты	1л РНК(+)	2л ДНК, кольцевая неполная	1л РНК (+)	1л РНК дефектный вирус	1л РНК (+)	1л РНК+
Систематическое положение	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Deltavirus	Hepavirus	Flaviviridae
Размер вириона (нм)	27	40	80	36	32-34	60
Строение	Простой	Сложный	Сложный	Сложный	Простой	Сложный
Культивирование в культуре клеток	Клетки гепатомы	Клетки гепатомы	-	-	-	?

Патогенность для животных	Шимпанзе мармозети	Шимпанзе	Шимпанзе	Шимпанзе	Шимпанзе	?
Репликация в гепатоците	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма	Ядро	Цитоплазма	?
Антигенные варианты	Вирусспецифический антиген	HBsAg, HBcAg, HBeAg, HBxAg	Несколько субтипов	2 формы: малая, большая	Неоднородный	5 филогенетических групп
Онкогенность	-	+	+	+	-	+
Ассоциируется с другими HV				HBV		HCV, HAV, HBV
Механизм передачи	Фекально-оральный	Парентеральный Половой	Парентеральный Половой	Парентеральный	Фекально-оральный	Парентеральный
Факторы передачи	Вода, еда	Кровь, сперма, влагалищный секрет	Кровь	Кровь	Вода, еда	Кровь
Группы риска	Дети	Медики, реципиенты крови, наркоманы, половые партнеры, дети ВГВ-положительных матерей	Медики, реципиенты крови, наркоманы, половые партнеры, пациенты гемодиализа	Больные с ВГВ, медики, реципиенты, наркоманы	Молодые люди из Азии, Африки	Медики, реципиенты, наркоманы, половые партнеры, пациенты гемодиализа
Профилактика	Инактивированная и живая вакцина	1. Плазменная вакцина (из крови HBsAg-носителей) 2. Генно-инженерная дрожжевая 3. Рекомбинантная поксвирусная	Интерферон	Не разработана	Не разработана	Не разработана

Таблица 1. Характеристика вирусов, вызывающих гепатит и претендующие на эту роль.

Вирус	HAV	HBV	HCV	HDV	HEV
Нуклеиновая кислота	Одноцепочечная РНК	Двухцепочечная кольцевая ДНК	Одноцепочечная линейная РНК	Одноцепочечная линейная РНК	Одноцепочечная РНК
Семейство	Picornaviridae	Hepadnaviridae	Flaviviridae	Не классифицирован	Hepeviridae
Род	Hepatovirus		Hepacivirus		Hepevirus
Размер частицы	27-32 нм	40-48 нм	50 нм	28-39 нм	27-34 нм
Генотипы	6	8	6	3	4
Хозяин	Человек, обезьяны	Человек, обезьяны	Человек	Человек, сурок	Человек, обезьяны
Основные	AgHAV	HBsAg, HBcAg	Структурные	HDAg	HEAg

антигены (белки)					
Интеграция нуклеиновой кислоты	Нет	Есть	Нет	Нет	Нет
Основное место репликации	Гепатоцит, пиеровы бляшки толстого кишечника	Гепатоцит	Гепатоцит	Гепатоцит	Гепатоцит
Устойчивость	Высокая	Высокая	Средняя	Высокая	Средняя
Передача вируса	Энтеральная	Парентеральная	Парентеральная	Парентеральная	Энтеральная
Заболевание	Острый гепатит	Острый и хронический гепатит	Острый и хронический гепатит	Острый и хронический гепатит	Острый гепатит
Носительство	Нет	Есть	Есть	Есть	Нет
Наличие вакцины	Есть	Есть	Нет	Нет	Есть

Таблица 1. Характеристика вирусов, вызывающих гепатит и претендующие на эту роль (продолжение)

Вирус	GBV-C/HGV	TTV	SENV	HFV
Нуклеиновая кислота	Одноцепочечная РНК	Одноцепочечная ДНК	Одноцепочечная кольцевая	Одноцепочечная ДНК
Семейство	Flaviviridae	Circoviridae	Circoviridae	Не классифицирован
Род		Anellovirus		
Размер частицы	50 нм	30-50 нм	?	?
Генотипы	6	Более 20	8	?
Хозяин	Человек, обезьяны	Человек, обезьяны, коровы	Человек	Человек
Основные антигены (белки)	Ag HGV	Три белка	?	?
Интеграция нуклеиновой кислоты	Нет	Нет	Нет	Нет
Основное место репликации	Лимфоциты, селезенка	Гепатоцит	Гепатоцит, ?	Гепатоцит, ?
Устойчивость	Средняя	Нет данных	Нет данных	Нет данных
Передача вируса	Парентеральная	Парентеральная	Парентеральная	Парентеральная
Заболевание	Острый и хронический гепатит	Гепатит? Фиброз легких? Апластическая анемия? Поражение желчных путей	Острый и хронический гепатит?	Острый и хронический гепатит
Носительство	Есть	Есть (свыше 90%)	Есть	Есть
Наличие вакцины	Нет	Нет	Нет	Нет

Задание 1. Провести учет реакции ИФА, поставленной с целью выявления HBs - антигена вируса гепатита В.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
E	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Вывод: Пробы B1, E3, G2 являются серопозитивными в отношении вируса гепатита В.

Диагностические маркеры ВГ

Таблица 2.

Нозология	Маркер	Характеристика маркера	Клиническое значение
Гепатит А	IgM анти-NAV	антитела класса М к вирусу гепатита А	указывают на острую инфекцию
	IgG анти-NAV	антитела класса G к вирусу гепатита А	свидетельствуют о перенесенной инфекции или NAV-постинфекции, сохраняются в крови пожизненно
Гепатит Е	IgM анти-HEV	антитела класса М к вирусу гепатита Е	указывают на острую инфекцию
	IgG анти-HEV	антитела класса G к вирусу гепатита Е	свидетельствуют о перенесенной инфекции или HEV-пастинфекции
Гепатит В	HBsAg	поверхностный антиген HBV	маркирует инфицированность HBV
	HBeAg	ядерный "e"-антиген HBV	указывает на репликацию HBV в гепатоцитах, высокую инфекционность крови и высокий риск перинатальной передачи вируса
	HBcAg	ядерный "core" антиген HBV	маркирует репликацию HBV в гепатоцитах, обнаруживается только при морфологическом исследовании биоптатов печени и на аутопсии, в крови в свободном виде не выявляется
	анти-HBc (total) (HBcAb)	суммарные антитела к HBcAg	важный диагностический маркер, особенно при отрицательных результатах индикации HBsAg, используется для ретроспективной диагностики ГВ и при неверифицированных гепатитах, определяют

			HBcAb без разделения на классы
	IgM анти-НВс (НВсAb IgM)	антитела класса М к ядерному антигену	один из наиболее ранних сывороточных маркеров ГВ, наличие его в крови указывает на острую инфекцию (фазу болезни), при хроническом ГВ маркирует репликацию HBV и активность процесса в печени
	анти-НВе (НВеAb)	антитела к "е"-антигену	может указывать на начало стадии реконвалесценции (исключение - мутантная форма HBV)
	анти-НВс (НВсAb)	протективные антитела к поверхностному антигену HBV	указывают на перенесенную инфекцию или наличие поствакцинальных антител (их защитный титр от HBV-инфекции 10МЕ/л); обнаружение же антител в первые недели ГВ прогнозирует развитие гипериммунного варианта фульминантного ГВ
	HBV-DNA	ДНК вируса ГВ	маркер наличия и репликации HBV
Гепатит D	IgM анти-HDV	антитела класса М к вирусу гепатита D	маркируют репликацию HDV в организме
	IgG анти-HDV	антитела класса G к вирусу гепатита D	свидетельствуют о возможной инфицированности HDV или перенесенной инфекции
	HDAg	антиген вируса ГD	маркер наличия HDV в организме
	HDV-RNA	РНК вируса ГD	маркер наличия и репликации HDV
Гепатит С	анти-HCV IgG	антитела класса G к вирусу гепатита С	свидетельствуют о возможной инфицированности HCV или перенесенной инфекции (определяются в скрининговых исследованиях)
	анти-HCV core IgM	антитела класса М к ядерным белкам HCV	указывают на текущую инфекцию (острая или хроническая в фазе реактивации)
	анти-HCV core IgG	антитела класса G к ядерным белкам HCV	свидетельствуют об инфицированности HCV или перенесенной инфекции
	анти-HCV NS	антитела к неструктурным белкам HCV	обычно обнаруживаются в хронической стадии ГС
	HCV-RNA	РНК вируса ГС	маркер наличия и репликации HCV
Гепатит G	HGV-RNA	РНК вируса ГG	маркер наличия и репликации HGV

Ориентировочная интерпретация диагностических данных при выявлении маркеров вирусных гепатитов

Выявленные маркеры	Диагноз	Примечание
IgM анти-НАV и HBsAg	Вирусный гепатит А. Сопутств.: "носительство HBsAg".	При типичных признаках острого ГА. Необходимо тщательное клинико-лабораторное исследование для исключения ОГВ и ХГВ.
IgM анти-НАV, HBsAg, анти-НВс (total), IgG анти-НВс	Вирусный гепатит А. Сопутств.: хронический гепатит В (нерепликативная фаза).	При выявлении признаков хронического гепатита у больных острым ГА и отсутствии маркеров репликации (HBV-DNA, HBeAg, IgM анти-НВс).
IgM анти-НАV, HBsAg, анти-НВс (total), IgG	Вирусный гепатит А. Сопутств.: хронический	При выявлении признаков хронического гепатита у больных

анти-НВс, IgM анти-НВс, НВеАg, HBV-DNA НВсАg, НВеАg, IgM анти-НВс, IgM анти-HDV HDV-RNA, IgM анти-HDV, НВсАg	гепатит В (репликативная фаза). Острая коинфекция ВГВ и ВГD. Острая суперинфекция ВГD.	острым ГА. При отсутствии IgG анти-НВс и клинико-анамнестических признаков обострения ХГВ При отрицательных результатах обследования на IgM анти-НВV (или низких титрах этих антител). Только у практически здоровых при отсутствии эпидемиологических данных и клинико-лабораторных признаков поражения печени.
Анти-НСV IgG	Реконвалесцент ВГС (или ВГС-пастинфекция) - при отрицательных результатах исследования на: IgM анти-НСV и НСV-RNA. При невозможности подобного исследования	Диспансерное наблюдение такое же, как при диагнозе "носительство НВсАg"
Анти-НСV (total), анти-НСV core IgM, НСV-RNA	Острый вирусный гепатит С.	При наличии эпидемиологических и клинико-лабораторных признаков острого гепатита и отсутствии маркеров других ВГ. Диспансерное наблюдение такое же, как и при ОГВ.
Анти-НСV IgG, анти-НСV core IgM, анти-НСV core IgG, анти-НСV NS, НСV-RNA	Хронический вирусный гепатит С (фаза реактивации).	При наличии клинико-биохимических признаков хронического поражения печени. Диспансерное наблюдение такое же, как при ХГВ.
Выявленные маркеры Анти-НСV IgG анти-НСV core IgG, анти-НСV NS	Диагноз Хронический вирусный гепатит С (латентная фаза).	Примечание При отсутствии в крови НСV-RNA, анти-НСV core IgM и клинико-биохимических признаков обострения ХГС.
НВсАg, IgM анти-НВс, НВеАg, анти-НСV IgG, анти-НСV core IgM, анти-НСV core IgG, анти-НСV NS, НСV-RNA	Острый вирусный гепатит В Сопутств.: хронический вирусный гепатит С (фаза деактивации)	При наличии клинико-лабораторных признаков ОГВ. Сопутствующий диагноз является следствием детального клинико-лабораторного обследования на ГС.
НВсАg, IgM анти-НВс, НВеАg, анти-НСV IgG, анти-НСV core IgG, анти-НСV NS	Острый вирусный гепатит В Сопутств.: хронический вирусный гепатит С (латентная фаза)	При наличии клинико-лабораторных признаков ОГВ. Сопутствующий диагноз является следствием детального клинико-лабораторного обследования на ГС.
НВсАg, IgM анти-НВс, НВеАg, анти-НСV (total), анти-НСV core IgM, НСV-RNA	Острая коинфекция ВГВ/ВГС	При наличии лишь клинико-лабораторных и эпидемиологических признаков, характерных для острых вирусных гепатитов.
Анти-НСV (total), анти-НСV core IgM, НСV-RNA, НВсАg, анти-НВс (total), IgG анти-НВс	Острый вирусный гепатит С. Сопутств.: хронический гепатит В (нерепликативная фаза).	При наличии эпидемиологических и клинико-лабораторных признаков острого ГС.
Анти-НСV (total), анти-НСV core IgM, НСV-	Острый вирусный гепатит С. Сопутств.: хронический	При наличии эпидемиологических и клинико-лабораторных признаков

RNA, HBsAg, анти-НВс гепатит В (репликативная острого ГС и хронического ГВ.
(total), IgG анти-НВс, фаза).
IgM анти-НВс, НВсAg,
HBV-DNA

Препараты для специфической профилактики гепатитов

Наименование	Состав	Показания
Вакцина гепатита А и В «ТВИНРИКС™ / TWINRIX™» (Бельгия)	инактивированная, культуральная вакцина	по эпидпоказаниям
Вакцина гепатита А «Аваксим 160U / AVAXIM 160U» или детская 80U / AVAXIM 80U (Франция)	инактивированная, культуральная вакцина	по эпидпоказаниям
Вакцина гепатита А «НАУРИХ» (Англия)	инактивированная, культуральная вакцина	по эпидпоказаниям
Вакцина гепатита В «Комбиотех» (Россия)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам
Вакцина для профилактики гепатита В «Heberbiovac НВ®/Ебербіовак НВ», "in bulk" (Куба)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам
Вакцина гепатита В «Регевак» (Россия)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам
Вакцина для профилактики гепатита В (Украина)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам
Вакцина для профилактики гепатита В «Гепавакс-Ген®/Неравах-Gene®» (Корея)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам
Вакцина для профилактики гепатита В «Гепатоіmun Імуноглобулін» (Украина)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам
Вакцина гепатита В «Энджерикс В» (Россия, Бельгия)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам
Вакцина гепатита В «Эувакс В» (Франция, Южная Корея)	генно-инженерная рекомбинантная дрожжевая вакцина	по прививочному календарю детям и подросткам

Вопросы для самоконтроля.

Задание 2. Ознакомиться с препаратами для специфической профилактики вирусных гепатитов.

1. Комбинированная вакцина для профилактики гепатита А и гепатита В TWINRIX.

2. Рекомбинантная дрожжевая вакцина против гепатита В - ENGERIX.

Вирус бешенства

Актуальность темы. Сказ - вирусное заболевание, протекающее с тяжелым поражением нервной системы и заканчивающееся, как правило, смертельным исходом.

Болезнь известна человечеству на протяжении нескольких тысячелетий. Впервые описана К. Цельсом в I в. н.э. В 1885 г. Л. Пастер получил и с успехом использовал вакцину для спасения людей, укушенных бешеными животными. Вирусная природа болезни доказана в 1903 г. П. Ремленже.

Бешенство (синонимы: rabies, lyssa, hydrophobia- водобоязнь) - особо опасная инфекционная болезнь человека и теплокровных животных, передается при контакте с инфицированным животным (укус, ослюнения микроповреждений), характеризуется поражением ЦНС и смертельным исходом.

Таксономия. Возбудитель бешенства - вирус, содержащий РНК, относится к семейству Rhabdoviridae (от греч. Rhabdos- прут), рода Lyssavirus.

Морфология и химический состав. Вирионы пулевидной формы, размером 170x70 нм, состоят из сердцевины, окруженной липопротеидной оболочкой из шипиков гликопротеидной природы. РНК - однонитевая, минус-нитевая.

Культивирования. Вирус бешенства культивируют в мозговой ткани белых мышей, сирийских хомяков, кроликов, крыс, морских свинок, овец и др.

У зараженных животных развиваются параличи конечностей, затем они погибают. Вирус бешенства может быть адаптирован к первичным культурам клеток, к перевиваемым клеткам и куриных эмбрионов. В цитоплазме пораженных вирусом клеток головного мозга животных или культур ткани образуются специфические включения, впервые описанные В. Бабешом (1892) и А. Негри (1903) и поэтому названы тельцами Бабеша-Негри. Включения сферической или овальной формы, величиной от 0,5 до 20 мкм, хорошо окрашиваются кислыми красителями, содержат вирусный антиген, имеют диагностическое значение.

Антигенная структура. В составе вируса бешенства выявлены сердцевинные и поверхностные антигены. Гликопротеидный антиген (белок шипики) обладает выраженными иммуногенными свойствами. Существуют два вируса бешенства, идентичные по антигенным свойствам: **дикий**, циркулирующий среди животных, патогенный для человека, названный уличным вирусом, и **фиксированный вирус** (virus fixe), полученный Л. Пастером в лабораторных условиях путем длительных пассажей уличного вируса через мозг кроликов. В связи с потерей последним вирулентности для человека Л. Пастер использовал этот вирус как антирабическую вакцину.

Эпидемиология. Бешенство известно с давних времен. Это типичная *зоонозная инфекция*, которая широко распространена на земном шаре. Все теплокровные животные могут болеть бешенством. Однако из-за особенностей механизма передачи (через укус) циркуляцию вируса в природе обеспечивают дикие и домашние

плотоядные животные, главным образом собаки, волки, лисы, енотовидные собаки, шакалы, кошки. Природные очаги бешенства является повсеместно. Человек является случайным звеном в эпидемическом процессе и не принимает участия в циркуляции вируса в природе.

Патогенез и клиническая картина. Вирус бешенства обладает выраженными нейротропными свойствами. С места внедрения вирусы поступают в ЦНС по периферическим нервным волокнам, размножаются в ней, а затем распространяются от центра, поражая всю нервную систему, в частности, нервные узлы некоторых железистых органов, особенно слюнных желез. В последних вирусы размножаются и выделяются со слюной в окружающую среду. Инкубационный период при бешенстве у человека варьирует от 7 дней до 1 года и более в зависимости от локализации и характера повреждения, а также вирулентности штамма. Самая короткая инкубация наблюдается при обширных укусах лица, головы, затем верхних конечностей и наиболее длинная - при укусе в нижние конечности.

В клинической картине бешенства у человека различают следующие периоды: предвестников (продромальный), возбуждение и параличей. Заболевание начинается с появления чувства страха, беспокойства, раздражительности, бессонницы, общего недомогания, воспалительной реакции в месте укуса. Во второй период болезни резко повышается рефлекторная возбудимость, появляются гидрофобия (водобоязнь), спазматические сокращения мышц глотки и дыхательной мускулатуры, затрудняющие дыхание; усиливается слюноотделение, больные возбуждены, иногда агрессивны. Через несколько дней возникают параличи мышц конечностей, лица, дыхательной мускулатуры. Продолжительность заболевания 3-7 дней. Летальность 100%.

Лабораторная диагностика. Лабораторные исследования проводят посмертно. В качестве исследуемого материала используют кусочки головного и спинного мозга, подчелюстные слюнные железы согласно правилам, предусмотренным для работы с особо опасным инфекционным материалом. Экспресс-диагностика основана на выявлении специфического антигена с помощью РИФ и ИФА и телец Бабеша-Негри. Выделяют вирус с помощью биопробы на белых мышах.

Специфическая профилактика и лечение. Вакцины против бешенства были разработаны и предложены Л. Пастером. Вакцины, полученные из мозга зараженных животных - кроликов, овец, могут вызвать осложнения, поэтому их используют редко. В нашей стране применяют антирабическую культуральную концентрированную вакцину, полученную из штамма Внуково-32 (происходит от фиксированного вируса Пастера), инактивированную УФ или гамма-лучами. Лечебно-профилактической вакцинации подвергаются лица, укушенные или ослюненные больными или подозрительными на бешенство животными. Прививки необходимо начинать как можно раньше после укуса. В тяжелых случаях применяют комбинированное введение антирабического иммуноглобулина и вакцины. Разрабатываются генно-инженерные антирабической вакцины.

Семейство	Rabdoviridae	
Морфология	Тип НК	РНК
	Форма	Пулевидная
	Уровень сложности	Сложный

	строения	
Антигенное строение	Выделяют «дикий» штамм и фикс-вирус	
Методы культивирования	Перевиваемые культуры HeLa; Куриный эмбрион; Белые мыши	
Резистентность	Стойкие к низким температурам Чувствительные к детергентам, спиртам, УФО	
Источник инфекции	Больные животные (кошачьи, псовые, рукокрылые, куничьи)	
Механизм и путь передачи заболевания	Укусы и ослизненные раны Инкубационный период – 12 дней – 1 год.	
Органотропность	Клетки ЦНС	
Иммунитет	Вируснейтрализующие АТ, интерферон	
Методы лабораторной диагностики	Экспресс-диагностика: РИФ, ИФА, РИА. Молекулярно-генетический: ПЦР. Серологический: РСК, РТГА. Биологический. Цитоскопический: выявление телец Бабеша-Негри в гистологических срезах головного мозга.	
Профилактика	3) Живая аттенуированная вакцина 4) культуральная иннактивированная вакцина 5) Иммуноглобулин	

Лабораторная диагностика арбовирусных инфекций.

Актуальность темы. Арбовирусы (от англ. Arthropod Borne viruses- вирусы, передаваемые членистоногими) - многочисленная экологическая группа вирусов, циркулирующих в природных очагах между восприимчивыми позвоночными животными и кровососущими членистоногими.

Таксономия. Арбовирусы не является единственной таксономической группой, а включают представителей различных семейств. Наибольшее число арбовирусов относится к семействам *Togaviridae* (более 30 представителей), *Flaviviridae* (около 60), *Bunyaviridae* (около 200), *Reoviridae* (60), *Rhabdoviridae* (около 50). В настоящее время известно около 450 арбовирусов, число которых постоянно растет за счет открытия новых представителей. Около 100 из них способны вызвать заболевания у людей. Наибольшее значение в патологии человека имеют вирусы клещевого энцефалита, японского энцефалита, Омской геморрагической лихорадки, Крымской геморрагической лихорадки, желтой лихорадки, лихорадки Денге, москитной (флеботомной) лихорадки.

Морфология, химический состав, антигенная структура. В зависимости от таксономического положения арбовирусы могут иметь сферическую или реже шаровидную (рабдовирусы) форму; размер вирусов от 40 до 100 нм. Состоят из РНК и белкового капсида, окруженного внешней липопротеидной оболочкой, на поверхности которой есть шипики, представленные гликопротеидами. Вирусы имеют

группоспецифические антигены, связанные с нуклеокапсидом, и видоспецифические антигены гликопротеидной природы. К настоящему времени известно около 70 антигенных групп арбовирусов. Большая часть арбовирусов обладает гемагглютинирующими свойствами.

Культивирование. Арбовирусы культивируют в организме новорожденных белых мышей, в культурах клеток (первичных и перевиваемых), иногда в куриных эмбрионах. У мышей-сосунков при заражении в мозг развивается острая инфекция с поражением ЦНС, которая заканчивается параличами конечностей и гибелью животных. Цитопатический эффект наблюдается только в некоторых культурах клеток.

Эпидемиология. Арбовирусы широко распространены на земном шаре, ареал обычно ограничен зоной обитания переносчиков, резервуаром арбовирусов в природе являются теплокровные и холоднокровные животные, особенно птицы, грызуны и летучие мыши. Основной механизм передачи - кровяной трансмиссивный (через укус инфицированного переносчика - кровососущего членистоногого). Специфическими переносчиками арбовирусов являются комары, клещи, москиты, мокрецы. Некоторые виды членистоногих способны к длительному пожизненному хранению возбудителя и передачи его потомству, то есть выполняют роль природного резервуара арбовирусов. При некоторых условиях арбовирусы могут передаваться через кровососущих членистоногих от человека к человеку. Сезонность заболеваний связана с периодом активности переносчика. В ряде случаев возможны другие механизмы и пути передачи этих вирусов - аэрогенный, алиментарный (через инфицированные пищевые продукты), контактный (при попадании крови больных поврежденную кожу). В лабораторных условиях заражение может произойти в результате вдыхания вирусного аэрозоля при высокой концентрации вирусов в воздухе, поэтому работа с арбовирусами должна проводиться с соблюдением специального защитного режима. Арбовирусы могут вызвать эпидемические вспышки и спорадические случаи заболевания.

Патогенез и клиническая картина. После укуса кровососущих членистоногих возбудитель с током крови заносится в регионарные лимфатические узлы, где происходит его первичная репродукция, потом он попадает в кровь (вирусемия). Далее вирусы могут поражать клетки центральной нервной системы, кровеносные капилляры кожи, слизистых оболочек, а также внутренние органы и ткани (печень, селезенку, почки и др.). В патогенезе арбовирусных инфекций значительную роль играют иммунологические реакции с развитием реакции ГЗТ. Клиническая картина арбовирусных инфекций характеризуется многообразием симптомов и форм проявления - от тяжелых случаев с летальным исходом в бессимптомных форм. Выделяют три группы синдромов:

- 1) системные лихорадки, иногда с сыпью и поражением суставов, протекающих доброкачественно;
- 2) геморрагические лихорадки;
- 3) энцефалит, характеризующийся тяжелым течением и высокой летальностью.

Иммунитет. После перенесенного заболевания формируется стойкий гуморальный типоспецифический иммунитет.

Лабораторная диагностика. В связи с высокой опасностью лабораторного заражения арбовирусами аэрогенным путем работа с ними может проводиться только в специально оборудованных лабораториях. Материалом для исследования служат кровь, спинномозговая жидкость, в летальных случаях - материал из всех органов. Для

диагностики некоторых арбовирусных инфекций разработаны экспресс-методы - РИФ, ИФА, РИА, РНГА, применяемые для выявления вирусного антигена. Универсальным методом выделения арбовирусов является заражение новорожденных (1- 3-дневных) мышей в мозг. При некоторых арбовирусных инфекциях (лихорадка Денге) используют культуры клеток. Выделенный вирус идентифицируют с помощью РСК, РТГА и РН. Эти же реакции применяют для серодиагностики арбовирусных инфекций.

Специфическая профилактика и лечение. Для создания активного иммунитета против ряда арбовирусных инфекций используют инактивированные формалином вакцины. Единственным исключением является живая вакцина против желтой лихорадки. Для лечения некоторых арбовирусных инфекций используют также препараты рибавирина, интерферона и др.

Таблица

Характеристика основных арбовирусов

Семейство	Род или группа	Синдромы и типичные возбудители	Циркуляция в природе
Аренавирусы	Вирусы Старого Света	ЛМ, ЭНЦ: вирус лимфоцитарного хориоменингита. ГЛ: вирус Ласса	Инфицированные грызуны, часто с постоянной вирусемией; обычно — вертикальная передача
	Вирусы Нового Света (комплекс Такарибе)	ГЛ: вирусы южноамериканских геморрагических лихорадок (Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сабия)	Инфицированные грызуны, часто с постоянной вирусемией; возможна вертикальная передача
Буньявирусы	Bunyavirus	ЭНЦ: вирусы серогруппы Калифорния (Ла Кросс, каньона Джеймстаун калифорнийского энцефалита) ЛМ: вирусы Буньявера, Тягиня, вирусы серогруппы С ЛМ: вирус Оропуш	Цикл комары—позвоночные; комарам свойственна трансвариальная передача (откладывание зараженных яиц); механизм передачи – трансмиссивный. Переносчики — мокрецы рода <i>Culicoides</i>
	Phlebovirus	ЛМ: вирусы сицилийской и неаполитанской лихорадок, вирус Тоскана. ЛМ: вирус Пунта-Торо ГЛ, ЛМ, ЭНЦ: вирус Рифт-Валли	Цикл москиты—позвоночные; москитам свойственна трансвариальная передача Цикл комары—позвоночные; комарам свойственна трансвариальная передача (откладывание зараженных яиц); механизм передачи – трансмиссивный.
	Nairovirus	ГЛ: вирус конго-крымской геморрагической лихорадки	Цикл иксодовые клещи—позвоночные; клещам свойственна трансвариальная передача (откладывание зараженных яиц); механизм передачи – трансмиссивный.
	Hantavirus	ГЛ: вирусы Хантаан, Дубрава, Пуумала ГЛ: вирус Син Номбр и родственные ему хантавирусы	Резервуар — грызуны; постоянное выделение вируса во внешнюю среду без хронической вирусемии Резервуар — мышинные (подсемейство <i>Sigmodontinae</i>)
<u>Филовирусы</u>		ГЛ: вирус Марбург, вирусы Эбола (3 вида)	Нет данных
Флавивирусы	Flavivirus (переносимые комарами)	ГЛ: вирус желтой лихорадки. ЛМ, ГЛ: вирусы денге (4 вида). ЭНЦ: вирус энцефалита Сент-Луис, вирус японского энцефалита, вирус	Цикл комары—позвоночные

		лихорадки Западного Нила, вирус энцефалита долины Муррея; вирус Росио	
	Flavivirus (переносимые иксодовыми клещами)	ЭНЦ: вирусы центрально-европейского и таежного весенне-летнего энцефалитов; вирус Повассан. ГЛ: вирусы омской геморрагической лихорадки и болезни кьясанурского леса	Цикл иксодовые клещи—позвоночные
Реовирусы	Coltivirus	ЛМ, ЭНЦ: вирус колорадской клещевой лихорадки	Цикл иксодовые клещи—позвоночные
Рабдовирусы ^б	Vesiculovirus	ЛМ: вирусы везикулярного стоматита (Индиана, Нью-Джерси); вирусы Чандипура, Пири	Цикл москиты—позвоночные; москитам свойственна трансовариальная передача (откладывание зараженных яиц); механизм передачи – трансмиссивный.
Тогавирусы	Alphavirus	АС: вирусы Синдбис, чикунгуния, Майяро; вирус реки Росс, вирус леса Барма. ЭНЦ: вирусы восточного, западного и венесуэльского энцефаломиелитов лошадей	Цикл комары—позвоночные

ЛМ — лихорадка и миалгия; ГЛ — геморрагическая лихорадка; ЭНЦ — энцефалит; АС — артрит и сыпь.

Таблица 10

Вторичные природно-очаговые вирусные менингоэнцефалиты и энцефаломиелиты, вызываемые представителями экологической группы арбовирусов

Нозологическая форма	Ареал	Название вируса, семейства, род	Основной резервуар возбудителя	Переносчики вирусов	Сезонность	Основные клинические синдромы	Летальность	Специфическая диагностика	Специфическая профилактика
Омская геморрагическая лихорадка	Россия (Омская, Новосибирская, Тюменская, Курганская, Оренбургская области)	Вирус омской геморрагической лихорадки, тогавирусы, флавивирус (группа В)	Клещи, ондатры и др. грызуны	Клещи, контакт с ондатрой	Май и август	Инкубационный период 3—8 сут., лихорадка, геморрагическая экзантема, кровотечения (носовые, легочные, кишечные, маточные), при тяжелых формах менингиты, менингоэнцефалиты	0,5—3,0%	Выделение вируса из крови на культурах ткани, мышцах, серологическое подтверждение в РСК и РН	—
Геморрагическая лихорадка Крым-Конго	Россия (южные области и края), Украина, Средняя Азия, Китай, Болгария, Югославия, страны Африки к югу от Сахары	Вирус геморрагической лихорадки Крым-Конго, буньявирусы, наировирус	Клещи, мелкие млекопитающие (мышь, суслик, заяц, ушастый еж), птицы	Клещи	Май—август	Инкубационный период 1—14 сут., лихорадка, геморрагическая экзантема и экзантема, кровотечения при тяжелых формах, менингиты, менингоэнцефалиты	—	То же	—
Лихорадка Западного Нила	Россия (южные области и края), страны СНГ, Европы (Франция, Германия, Венгрия), Египет, Израиль, Индия, Индонезия	Вирус лихорадки Западного Нила, тогавирусы, флавивирус (группа В)	Птицы, грызуны	Комары, клещи	Позднее лето—осень	Инкубационный период 3—21 сут., лихорадка, миалгии, артралгии, полилимфаденит, иногда макуло-папулезная экзантема, гематологический синдром, у 50% больных серозный менингит	—	То же	—

Нозологическая форма	Ареал	Название вируса, семейства, род	Основной резервуар возбудителя	Переносчики вирусов	Сезонность	Основные клинические синдромы	Летальность	Специфическая диагностика	Специфическая профилактика
Москитная (лихорадка паппатачи)	Средиземноморский бассейн, Крым, Балканы, Средний и Ближний Восток, Восточная Африка, Центральная Азия, Индия, Китай, Бразилия, Панама	Флебовирусы типов неаполитанской и сицилийской москитной лихорадки Пунта-Тодо, Чагрес и Кандиру. Бунья-вирусы, флебовирус	Москиты, человек, птицы	Москиты	Жаркое сухое время года	Инкубационный период 3—9 сут. Лихорадка, миалгия, артралгия, макулезная или уртикарная экзантема, пузырьковая экантема, у 12% больных — серозный менингит	—	То же	—
Колорадская клещевая лихорадка	США, Канада	Вирус колорадской клещевой лихорадки, реовирусы, орбивирус	Клещи	Клещи	Март—сентябрь	Инкубационный период 3—6 сут. Лихорадка, миалгия, артралгия, экзантема — только 15% случаев, редко — серозный менингит или энцефалит	—	То же	Живая ослабленная вакцина
Венесуэльский энцефалит лошадей	Северная часть Южной Америки, Центральная Америка, Мексика, Флорида	Вирус венесуэльского энцефалита, тогавирусы, альфа-вирус (группа А)	Дикие млекопитающие, домашние животные	Комары	Лето—осень	Инкубационный период 2—5 сут. Лихорадка, миалгии, признаки менингита и энцефалита от 3 до 38% случаев	Менее 0,5%	То же	Формоловая вакцина
Лихорадка долины Рифт	Южная и Восточная Африка (Кения, Египет)	Вирус Рифт-Валли, буньявирусы, флебовирус	Комары, домашние животные (овцы, козы, крупный рогатый скот, верблюды), полевые крысы	Комары	Лето—осень	Инкубационный период 3—6 сут. Лихорадка, миалгии, при тяжелых формах (1%) геморрагический синдром, гепатит (желтуха), энцефалит	0,25—0,5%	То же	Убитая вакцина

Арбовирусы. Вирусы клещевого энцефалита, ОГЛ, бешенства, хантавирусы.

Арбовирусы (от лат. *arthropoda* - членистоногие и англ. *borne* - передающийся, происходящий) - вирусы различных таксономических групп, передающиеся позвоночным (в т.ч. человеку) через кровососущих членистоногих (комаров, клещей, блох, вшей, клопов и др.). Арбовирусы - нетаксономическое понятие. В настоящее время известно более 400 арбовирусов, относящихся преимущественно к семействам тогавирусов, флавивирусов, буньявирусов, рабдовирусов, аренавирусов, реовирусов.

Большинство арбовирусов - возбудители природноочаговых зоонозов, распространенных в определенных (эндемичных) регионах и ландшафтных зонах. Они имеют характерных (специфических) переносчиков, определяющих эколого - эпидемиологические особенности арбовирусных инфекций. Передача возбудителей у членистоногих осуществляется трансвариально и трансфазово (по этапам метафорфоза) из поколения в поколение. Арбовирусы обладают способностью размножаться при температуре тела теплокровных животных, а также в организме членистоногих, температура тела которых зависит от природных условий окружающей среды.

Клинически арбовирусные инфекции проявляются преимущественно в трех вариантах - лихорадки неясного генеза (“денге - подобной”), поражения центральной нервной системы (энцефалита), геморрагической лихорадки.

Семейство Togaviridae (тогавирусы).

Свое название тогавирусы получили от лат. *toga* - плащ. Это сферические оболочечные вирусы с икосаэдральным нуклеокапсидом, заключенным в липидную оболочку. Геном представлен позитивной линейной РНК.

Собственно к арбовирусам относят род *Alphavirus* (альфа - вирусы или арбовирусы антигенной группы А) с типовым представителем - вирусом Синдбис. Альфа - вирусы имеют родоспецифический нуклеокапсидный белок и два гликопротеида суперкапсидной оболочки - E_1 - группоспецифический гемагглютинин и E_2 - видоспецифический белок, антитела к которому обладают вируснейтрализующими свойствами.

В состав рода входят возбудители ряда экзотических для России инфекций - восточного и западного американского, венесуэльского энцефаломиелитов лошадей, лихорадок Чикунгунья, Росс-Ривер и др. В России из вирусов этой группы встречается вирус карельской лихорадки. Многие альфавирусы экологически связаны с птицами.

Семейство Flaviviridae (флавивирусы).

По некоторым классификациям относят в качестве рода *Flavivirus* к семейству тогавирусов, имея ряд близких к другим тогавирусам характеристик. Строение вирионов в целом аналогично альфавирусам. Имеют капсидный белок, шипы суперкапсида состоят из двух белков, один из которых является гликопротеидом (E_1) и обладает гемагглютинирующей активностью. Гемагглютинирующие свойства альфа - и флавивирусов лучше выявлять в отношении птичьих (особенно гусиных) эритроцитов.

По данным РТГА альфавирусы разделяют на три, а флавивирусы - на четыре группы, представители которых (внутри групп) обладают перекрестной реактивностью по гемагглютину. Отличительная особенность флавивирусов - наличие неструктурного растворимого антигена, выявляемого в РСК.

Основные группы флавивирусов (антигенный комплекс по РТГА).

1. Группа клещевого энцефалита (КЭ, ОГЛ, Лангат, Повассан и др.).
2. Группа японского энцефалита (ЯЭ, Западного Нила, Сент- Луис и др.).
3. Группа желтой лихорадки.
4. Группа лихорадки Денге.

Флавивирусы по экологическим предпочтениям условно делят на преимущественно комариные (вирусы желтой лихорадки, энцефалита Сент- Луис, японского энцефалита, лихорадки Денге) и преимущественно клещевые (вирусы КЭ, ОГЛ, Повассан, Кьясанурской лесной болезни).

Клещевой энцефалит.

Клещевой энцефалит (КЭ) - широко распространенная в лесной зоне умеренного климатического пояса Евразии природноочаговая облигатно - трансмиссивная инфекция, переносчиками которой являются преимущественно иксодовые клещи рода *Ixodes*. В соответствии с основным видом переносчика выделяют два основных типа вируса КЭ - восточный (переносчик таежный клещ *Ixodes persulcatus*) и западный (переносчик - европейский лесной клещ *I. ricinus*). Наиболее тяжело протекает КЭ, вызываемый восточным вариантом, наиболее тяжелое течение с высокой частотой очаговых поражение головного мозга и наибольшая летальность - на Дальнем Востоке России). Наиболее типичные формы клинического проявления - лихорадочная, менингеальная и очаговая. Очаговая, наиболее тяжелая и прогностически неблагоприятная форма может сопровождаться параличами, поражением стволовых отделов мозга с нарушениями дыхательной и сердечной деятельности.

Нозоареал КЭ связан с ареалом основных переносчиков, распространенных преимущественно в лесной зоне. Сезонность заболеваний связана с периодом активности переносчиков (максимальная - в мае - июне).

Лабораторная диагностика. Основные методы - вирусологические и серологические. Вирус КЭ можно выделить из крови и спинномозговой жидкости больных, снятых с человека переносчиков. Чаще производят внутримозговое заражение сосунков белых мышей, у которых вирус вызывает развитие параличей и парезов. Идентификация вируса осуществляется в РТГА, РСК и различных вариантах реакции нейтрализации вируса, в последние годы - в ИФА и с помощью генетических методов.

При серологической диагностике используют РТГА (группоспецифическая диагностика), РСК (более специфический тест, позволяет дифференцировать КЭ и ОГЛ), в последние годы - ИФА для выявления IgM- и IgG- антител.

Профилактика. Выделяют неспецифическую профилактику (борьба с переносчиками, использование средств индивидуальной защиты), экстренную серопротективную профилактику (введение в случае присасывания клещей в очагах противоклещевого иммуноглобулина), специфическую вакцинопрофилактику (использование инактивированной вакцины). Ни один из этих методов не может полностью обезопасить человека на неблагополучной (эндемичной) территории от заболевания КЭ, однако применение вакцины, а также иммуноглобулина в ранние сроки (первые сутки с момента присасывания клеща) существенно улучшает клинический прогноз.

Омская геморрагическая лихорадка (ОГЛ).

ОГЛ - природноочаговая инфекция, эндемичная для лесостепных районов Западной Сибири (преимущественно Омская и Новосибирская области). Заражение людей может происходить через присасывание иксодовых клещей *Dermacentor reticulatus* (клещевой тип заражения) или нетрансмиссивным путем - при прямом или опосредованном контакте с ондатрами (ондатровый тип). В последние десятилетия абсолютно преобладает ондатровый тип заражения. У больных отмечается лихорадка и геморрагический синдром (мелкоточечная сыпь, носовые, желудочно - кишечные и маточные кровотечения).

Вирус ОГЛ близок по свойствам и происхождению к вирусу КЭ. Имеются гипотезы происхождения вируса ОГЛ от вируса КЭ. Вирус ОГЛ антигенно близок вирусу КЭ, их серологическая дифференциация осуществляется в РСК с растворимыми антигенами. Вакцинация против КЭ обеспечивает перекрестный протективный иммунитет против ОГЛ.

Семейство Bunyaviridae (буньявирусы).

Семейство буньявирусов считают крупнейшим по числу входящих в него вирусов (более 250). Оно включает пять основных родов и ряд не отнесенных к основным родам вирусов. Большинство членов семейства - типичные арбовирусы (рода *Bunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* и *Uukuvirus*), недавно к буньявирусам отнесены также природноочаговые вирусы рода *Hantavirus*.

Буньявирусы - сферические оболочечные вирусы с тремя нуклеокапсидами, содержащими по три линейных фрагмента негативной РНК. Оболочка липопротеидная, имеет гликопротеидные шипы, проявляющие гемагглютинирующие свойства.

Наибольшее распространение на территории России имеют вирусы рода *Hantavirus*. Хантавирусы Хантаан, Добрава, Пуумала, Сеул и другие вызывают геморрагическую лихорадку с почечным синдромом (ГЛПС).

ГЛПС - тяжелое природноочаговое зоонозное нетрансмиссивное заболевание, характеризующееся лихорадкой, геморрагическим синдромом, почечной недостаточностью, возможен легочной синдром. Наиболее эпидемически активные очаги выявлены на Дальнем Востоке (восточная часть нозоареала), в Европейской части России и на Урале (западная часть нозоареала). ГЛПС - одна из наиболее распространенных и тяжелых природноочаговых инфекций.

Основной резервуар и источник заражения хантавирусами - мелкие млекопитающие (особенно - рыжие полевки, наибольшая численность которых отмечена в липовых лесах). Заражение человека может происходить при прямом или опосредованном (загрязненная экскрементами грызунов почва, пищевые продукты, вода) контакте, в том числе аэрогенным путем (вдыхание инфицированной пыли).

Лабораторная диагностика. Вирусологическая диагностика не применяется, вирус можно выявить в паренхиматозных органах с помощью МФА с моноклональными антителами. Преимущественно используют серологическую диагностику - реакцию непрямой иммунофлюоресценции (РНИФ) с инфицированными вирусом клеточными культурами, исследуют парные сыворотки в динамике инфекционного заболевания.

Лечение - преимущественно патогенетическое, направленное на основные клинические синдромы. При острой почечной недостаточности, уремии и геморрагическом нефрозонефрите необходим гемодиализ.

Семейство Rhabdoviridae (рабдовирусы).

Выделяют три рода - Vesiculovirus, Sigmapvirus и Lyssavirus. Наибольшее значение имеет род лиссавирусов, к которому относится вирус бешенства.

Бешенство - летальная инфекция центральной нервной системы, связанная с попаданием рабдовируса со слюной (чаще в результате укусов) больных бешенством животных. Рабдовирусы - оболочечные РНК - вирусы пулевидной формы, геном образован негативной РНК. Вирус бешенства имеет широкий круг хозяев. Основной источник и резервуар этого лиссавируса - различные дикие плотоядные (волки, лисицы, шакалы и др.), от них происходит заражение домашних плотоядных - собак и кошек. Заболевание происходит через укус или ослушение.

Вирус из входных ворот мигрирует по аксонам периферических нервов в базальные ганглии и центральную нервную систему, где размножается в сером веществе, поражая нейроны гиппокампа, продолговатого мозга, черепных нервов, симпатических ганглиев, центробежно - в клетках слюнных желез. Вирус вызывает дегенеративные поражения нейронов с образованием в клетках телец включений, известных как тельца Бабеша - Негри (выявляют гистологически - включения проявляют эозинофилию и при окраске методом флюоресцирующих антител).

Клиника бешенства у человека достаточно характерна. Второе название болезни - гидрофобия (водобоязнь), у человека наблюдается возбуждение, нарушения тонуса мышц (в т.ч. затруднения глотания), галлюцинации, затем развиваются судороги и параличи. Смерть наступает от паралича сердечного или дыхательного центров.

Лабораторная диагностика. Применяют вирусологические методы - внутримозговое заражение белых мышей и других животных мозговой тканью или материалом подчелюстных слюнных желез. Выявляют *тельца Бабеша - Негри* (скопления вирусных нуклеокапсидов вблизи ядер клеток) окраской по Романовскому - Гимза или МФА.

Специфическая профилактика. Используется антирабическая инактивированная культуральная вакцина. Экстренная лечебно - профилактическая вакцинация проводится вакциной или вакциной в сочетании с антирабическим иммуноглобулином. Чем короче инкубационный период, тем хуже эффект специфической профилактики (наименьший инкубационный период - при укусах в голову, кисти рук). Обязательно проводят промывание и обработку ран или места попадания слюны с прижиганием спиртовым раствором йода.

Основа профилактики - борьба с бездомными собаками и кошками, вакцинация домашних животных. Проводятся попытки пероральной вакцинации (вскармливание разбросанных приманок с вакциной) диких плотоядных - основного резервуара вируса в природе.

Вопросы для самоконтроля

- Укажите, какие антигены вируса гепатита В можно выявить в сыворотке крови больных вирусным гепатитом В. Какие антигены вируса гепатита В можно выявить только в гепатоците?
- Какие маркеры острого вирусного гепатита В можно выявить в крови больного?
- Какие маркеры острого гепатита А можно выявить в крови больного?
- Какой маркер можно выявить в крови после вакцинации против вирусного гепатита В?
- Какие препараты применяют с целью специфической профилактики вирусного гепатита В?
- Какова минимальная инфицирующая доза вируса гепатита В при парентеральном попадании?
- Какие вирусы гепатитов могут приводить к развитию первичной гепатоцеллюлярной карциномы?
- Чем обусловлен высокий процент хронизации и резистентность к антивирусной терапии при вирусном гепатите С?
- Каков метод профилактики вирусного гепатита D?
- Какие вирусные гепатиты можно диагностировать в Украине? Какие методы лабораторной диагностики следует применить?
- Какие вирусы являются возбудителями вирусных гепатитов TTV и Sen? Регистрируются ли в Украине случаи этих заболеваний?

Практическое занятие №19

Тема: Ретровирусы. ВИЧ. Лабораторная диагностика ВИЧ-инфекции. Принципы и методы лабораторной диагностики. Онковирусы. Вирусно-генетическая теория происхождения опухолей

Актуальность темы.

СПИД называют чумой XX века, число жертв этой инфекции постоянно растет. Для предупреждения дальнейшего распространения ВИЧ-инфекции и ее

отрицательного влияния на социальные и экономические процессы в нашем государстве принят Закон Украины о предотвращении заболевания СПИДом, утверждена и реализуется программа профилактики СПИДа и наркомании, действует программа "Безопасность донорской крови".

На сегодня смертельно опасным вирусом иммунодефицита в мире ежедневно инфицируется около 7000 преимущественно молодых людей. Общий итог пандемии СПИДа в мире лишь за первые 17 лет достиг 33,4 миллиона ВИЧ-инфицированных и больных СПИДом. Ежемесячно в эпидемию ВИЧ-инфекции (СПИДа) вовлекается более 1200 граждан Украины. По темпам развития ВИЧ-инфекции наша страна в течение длительного времени занимает ведущие позиции. Все это обуславливает актуальность темы занятия и формирует позитивную мотивацию ее изучения.

Конкретные цели:

1. Изучить основные биологические свойства ретровирусов.
2. Овладеть современными методами лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции и СПИДа.
3. Проанализировать перспективу создания эффективных ретровирусных препаратов и современные подходы к профилактике и лечению ВИЧ-инфекции.

Перечень основных терминов, параметров, характеристик, которые должен усвоить студент при подготовке к занятию.

Термин	Определение
ВИЧ-инфекция	Заболевание, вызванное вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).
СПИД	Конечная стадия ВИЧ-инфекции, характеризующаяся разнообразными патологическими проявлениями, вызванными глубоким поражением иммунной системы вирусами иммунодефицита человека.
Обратная транскриптаза (ревертаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза)	Фермент, непосредственно связанный с вирусной РНК, определяет стратегию вирусного генома в клетке, обеспечивая некоторые этапы репродукции вирусов (на вирусной РНК создает ее ДНК-копию).
Скрининг	(screening - отбор). В случае ВИЧ-инфекции - исследование сывороток определенных популяций населения (доноров, беременных, наркоманов, и др.), проводимое с целью выявления сывороток, содержащих противовирусные антитела.
СПИД - ассоциированные болезни	заболевания, проявляющиеся на поздних стадиях развития ВИЧ-инфекции и считающиеся проявлением СПИДа.
Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	Метод выявления и идентификации вирусов и микробов в исследуемых материалах. Принцип метода основывается на многократном копировании (селективной амплификации) исследуемой нуклеиновой кислоты ферментом ДНК - полимеразой.

Теоретические вопросы к занятию:

- Общая характеристика и классификация онкогенных вирусов.
- Вирусо-генетическая теория возникновения опухолей по Л. А. Зильберу.

Механизмы вирусного канцерогенеза.

- Морфология и химический состав вирусов иммунодефицита человека.

Типы ВИЧ.

- Происхождение и эволюция ВИЧ. Особенности генома.
- Культивирование ВИЧ, стадии взаимодействия этих вирусов с чувствительными клетками.
- Клетки-мишени для ВИЧ в организме человека, характеристика поверхностных вирусных рецепторов.
- Механизм развития иммунодефицита. СПИД-ассоциированная патология (оппортунистические инфекции и опухоли).
- Методы лабораторной диагностики СПИДа (иммунологические, генетические).
- Перспективы специфической профилактики и терапии ВИЧ-инфекции.

Практические задания, выполняемые на занятии:

1. Занести в протокол схему лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции.
2. Осуществить учет лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции с помощью ИФА, сделать вывод.
3. Ознакомиться с диагностическими тест-системами, лечебно-профилактическими препаратами, которые используются при ВИЧ-инфекции.

Содержание темы.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) относят к семейству *Retroviridae*. Вирус сложный, сферической формы. Имеет двухцепочную РНК. Антигенное строение: поверхностные Аг (гликопротеины суперкапсида (gp 41, gp 120), внутренние типоспецифические Аг (структурные белки капсида - матриксный белок - p17, капсидный белок - p 24, связующие белки - p9 и p6). Методы культивирования: перевиваемые культуры лейкозных Т-хелперов, монослой культуры астроцитов, первичные культуры Т-хелперов, стимулированные ИЛ-2. Резистентность: чувствителен к H₂O₂, концентрированных кислот и щелочей, жирорастворителям (этиловый спирт, эфир, ацетон), глютаральдегиду; устойчив к низким температурам, ионизирующей радиации, УФЛ. Источник заражения - больной человек, носитель (ВИЧ-инфицированный). Механизм и пути передачи заболевания: парентеральный. Половой, трансфузионный, инструментальный, инъекционный, трансплантационный, трансплацентарный пути. Органотропность: клетки с CD -4 рецепторами: макрофаги, моноциты, дендритные клетки лимфатических узлов, астроциты, олигодендроциты головного мозга, клетки Лангерганса, Т-хелперы. Иммуниет: развивается иммунодепрессия. Методы лабораторной диагностики: ИФА; РИА; иммуноблотинг; ПЦР. Профилактика: раннее выявление источника инфекции; разрыв механизмов и путей передачи инфекции. Терапия: нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы протеазы, ингибитор интегразы, блокаторы вирусных рецепторов.

На практическом занятии студенты знакомятся с классификацией и основными биологическими свойствами ретровирусов, детально останавливаются на морфологических, физико-химических свойствах, ультраструктуре, антигенном строении ВИЧ, методах лабораторной диагностики и перспективах специфической профилактики и лечения ВИЧ-инфекции. Студенты рассматривают и анализируют схему постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР), поставленной с целью лабораторной диагностики ВИЧ/СПИДа а также с ее модификацией, которая обеспечивает количественное определение РНК ВИЧ в крови больных. Рассматривают принципы иммуноблота. Проводят учет реакций ИФА, поставленной с целью серологической диагностики ВИЧ.

Составляя схему лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции и СПИДа, студенты используют знания, приобретенные во время самостоятельной подготовки и в процессе рассмотрения темы на занятии. Кроме того, студенты на занятии знакомятся с препаратами для лабораторной диагностики ВИЧ-инфекции. Выполненные задания студенты записывают в протокол и подписывают его у преподавателя.

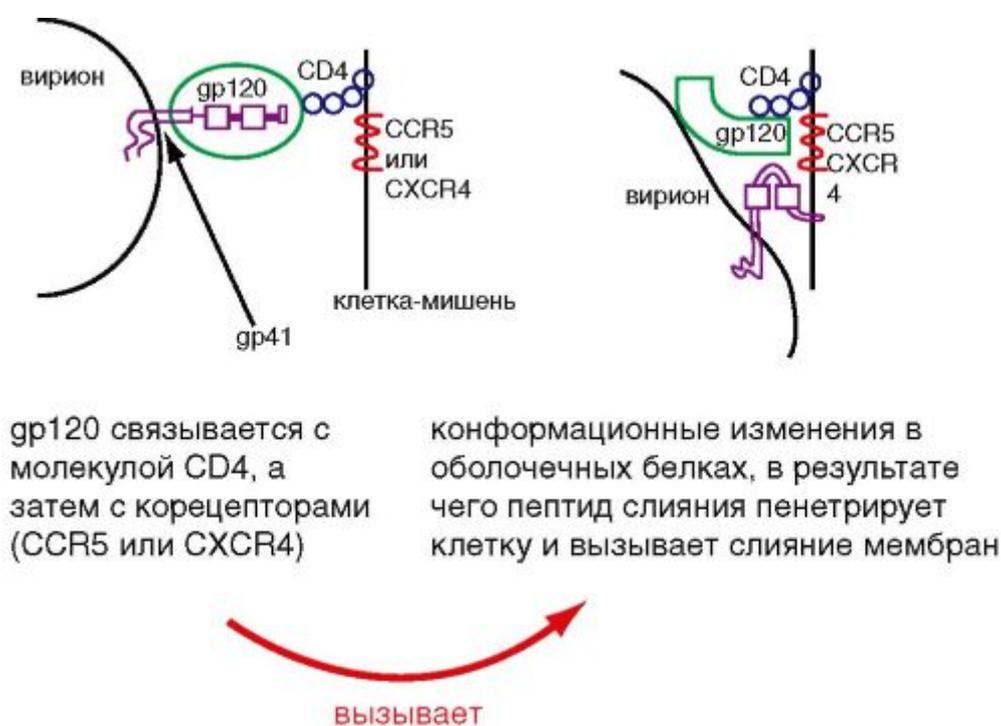


Схема. Взаимодействие ВИЧ-1 с CD4 и корецепторами.

Ретровирусы. Вирус иммунодефицита человека.

Особенности репродукции связаны с функциями фермента *обратной транскриптазы* (ревертазы или РНК - зависимой ДНК - полимеразы), обладающей тремя видами активности - обратной транскриптазы, РНК - азы и ДНК - полимеразы.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ или HIV) относится к семейству ретровирусов, подсемейству лентивирусов (медленных вирусов). Геном ретровирусов уникален - он представлен двумя идентичными молекулами позитивной РНК, т.е. это РНК - вирусы с диплоидным геномом. Свое название ретровирусы получили за отличительные особенности репродукции РНК.

Семейство Retroviridae включает три подсемейства.

1. Lentivirinae - возбудители медленных вирусных инфекций, в т.ч. ВИЧ.

2. Oncovirinae - онкогенные вирусы, с которыми связано превращение клеток в опухолевые. Раньше не знали, как РНК - вирусы могут встраиваться в геном клетки и способствовать опухолевому росту (не были известна возможность обратной транскрипции у вирусов), что тормозило научную разработку вирусологии опухолевого роста.

3. Spumavirinae - “пенящие” вирусы, название которых связано с характерным “вспененным” видом инфицированных ими клеточных культур как результатом интенсивного симпластообразования.

Первыми открытыми в конце 70-х годов ретровирусами были HTLV-1 и HTLV-2 (от “human T-lymphotropic virus”) - возбудители Т - клеточных лейкозов и лимфом. Наиболее известны обладающие лимфотропным и цитопатическим действием вирусы ВИЧ-1 (HIV-1 в английском варианте) и ВИЧ-2, вирус иммунодефицита обезьян (ВИО или SIV), к которому по ряду свойств ближе (чем к ВИЧ-1) ВИЧ-2. К настоящему времени имеется информация уже о нескольких сотнях ретровирусов, интегрированных с геномом человека и практически очень мало об их роли в патологии.

История изучения и происхождения ВИЧ.

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) впервые выделен как самостоятельное заболевание в США в 1981г. Возбудитель (ВИЧ-1) был описан почти одновременно в 1983г. французом Л.Монтанье и американцем Р.Галло. Эпидемиология нового вида патологии поражала своей необычностью. Почти 100% больных были мужчинами в возрасте 25-49 лет, 94% - гомо- или бисексуалами, отмечалась высокая летальность. У больных были выявлены дефекты клеточного иммунитета, развитие пневмоцистной пневмонии, кандидоза и саркомы Капоши у них было расценено как оппортунистические заболевания. СПИД окрестили **болезнью четырех “Н”** - по первым буквам английских вариантов слов гомосексуалы, гемофилия, гаитяне и героин. В 1986г. был идентифицирован еще один вирус - ВИЧ-2.

Окончательного ответа на вопрос о месте, времени и условиях возникновения ВИЧ нет. Ретроспективные исследования показали циркуляцию этого вируса по крайней мере с конца 50-х - начала 60-х годов. Прародительницей ВИЧ считают тропическую Африку, где широко распространен ВИО (близкородственный ВИЧ-2) среди обезьян. Первые известные серологические находки ВИЧ отмечены в Африке, здесь же - наибольшая интенсивность передачи ВИЧ наиболее естественным гетеросексуальным путем. Однако эпидемическое распространение ВИЧ - инфекция получила с конца 70-х - начала 80-х годов. В 1987г. выявлен первый случай в России, в настоящее время счет идет на десятки тысяч инфицированных в год. В мире регистрируют десятки миллионов инфицированных ВИЧ в год, ежегодно число вновь инфицированных увеличивается, т.е. налицо пандемия ВИЧ - инфекции.

Структура вириона ВИЧ.

ВИЧ имеет сферическую форму и размеры 100-120 нм в диаметре. Наружная оболочка образована двойным липидным слоем с гликопротеиновыми “шипами”, состоящими из трансмембранного белка **gp41** (пронизывает липидный слой) и наружного белка **gp120**. Эти оболочечные белки кодируются геном env и участвуют в прикреплении вириона к мембранам клеток хозяина. С внутренней стороны липидной оболочки находится матричный каркас, образованный белком **p17**. Он окружает внутреннюю структуру вириона - нуклеокапсид или сердцевину (англ. - core).

Собственная оболочка сердцевины образована “коровским” белком p24. Внутри нуклеокапсида находится геном вируса в виде двух цепочек, связанных белками p7 и p9, полимеразный комплекс ревертазы, протеаза, интеграза (эндонуклеаза), затравочная т - РНК. Наиболее распространен ВИЧ-1, который в зависимости от строения гена env имеет субтипы. Субтипы А-Н составляют доминирующую группу М (major), наиболее распространены субтипы С и Е.

Жизненный цикл ВИЧ.

Инфекционный процесс при заражении ВИЧ носит последовательный фазовый характер и начинается с проникновения вируса через слизистую оболочку половых путей или с непосредственного поступления в кровоток. Проникнув в организм, вирус в первую очередь атакует клетки, имеющие специфичный для него рецептор CD4. Этот рецептор имеют в большом количестве Т - хелперы, в меньшем - макрофаги и моноциты, нейроны, клетки нейроглии и некоторые другие клетки (см. лекции по общей иммунологии). Вирус распознает CD4 - рецепторы с помощью своего белка gp120. Процесс инфицирования клетки вирусом осуществляется в два этапа : прикрепления и слияния. Прикрепленный через белок gp120 к рецептору CD4 клетки - мишени вирус белком оболочки gp41 сливается с мембраной клетки. Белок gp41 обеспечивает не только слияние вирусной и клеточной мембран, но и слияние мембран клеток с образованием синцития (многоядерных клеток), обреченного на гибель. Нуклеокапсид, освобожденный от суперкапсида при слиянии мембран, попадает в цитоплазму. На пути к ядру освобождается геномная РНК и ассоциированные с ней компоненты сердцевины. Обратная транскриптаза синтезирует на вирионной РНК минус - цепь ДНК, РНК-аза разрушает вирионную РНК, а вирусная ДНК - полимераз синтезирует на минус - цепи плюс - цепь ДНК.

Двунитевая ДНК транспортируется в ядро клетки, где приобретает кольцевую форму и интегрируется под действием эндонуклеазы (интегразы) с ядром клетки, превращаясь в ДНК - провирус. Последующие этапы жизненного цикла ВИЧ - латентная фаза, фаза активации транскрипции с ДНК- провируса и последующая трансляция белков вируса, наработка компонентов вируса и формирование новых вирионов, их выход из клетки, сопровождающийся цитопатическим эффектом для клетки - мишени.

ДНК - провирус может длительно находиться в неактивном состоянии (персистентное инфицирование). В этот период вирус можно выявить только с помощью ПЦР. Активация транскрипции особым ядерным фактором в результате действия иммунокомпетентных клеток или микробных антигенов приводит к продуктивной фазе - активному размножению ВИЧ. Факторы экспрессии генов ВИЧ - специфические антигены (прежде всего - герпес - вирусы), неспецифические митогены (фитогемагглютинин), цитокины (фактор некроза опухолей, интерфероны, гамма - интерферон), бактериальные иммуномодуляторы (фосфолипиды сальмонелл), глюкокортикостероиды.

Антигенные свойства ВИЧ.

Функция обратной транскриптазы не подвергается контролю, что обуславливает высокую частоту генетических ошибок при репликации и мутации структурных белков вируса. С учетом частоты изменчивости ни один ВИЧ не производит при репликации вирион, в точности соответствующий родительскому. Высокая генетическая изменчивость реализуется в вариабельности антигенных и биологических свойств ВИЧ. Высокой изменчивостью характеризуется продукт гена

env - оболочечный белок gp120, особенно петлеобразный V3 - домен (из 35 аминокислот), к которому образуется до 90-95% всех вируснейтрализующих антител.

ВИЧ-1 и ВИЧ-2 имеют существенные отличия в строении, гомология первичной структуры геномов составляет только около 42%, перекрестного иммунитета между этими вирусами нет. Антигенными свойствами обладают все основные структурные элементы вириона, прежде всего - белки. Исключительная генетическая и антигенная изменчивость позволяет вирусу выживать в инфицированном организме.

Наряду с генетическими особенностями, ВИЧ-1 имеет фенотипические различия по ряду свойств - эффективности репликации, характеру цитопатического действия и способности образовывать синцитий (этот признак связан с вирулентностью), преимущественному тропизму к клеткам - моноцитотропные изоляты (начальные этапы болезни) и лимфотропные изоляты (разгар болезни).

Патогенез СПИДа.

Рецептором для ВИЧ является дифференцировочный антиген CD4, имеющий гомологичные участки с иммуноглобулинами и белком gp120 ВИЧ. Расположенный на мембранах Т-хелперов и Т-индукторов, рецептор CD4 в комплексе с белками HLA II класса выполняет функцию распознавания антигенов. Фиксация вируса через gp120 ВИЧ-1 (или gp105 ВИЧ-2) с мембранным рецептором CD4 блокирует основную функцию этих иммунокомпетентных клеток - восприятие сигналов от антигенпредставляющих клеток. Последующая репликация вируса ведет к гибели этих клеток и выпадению их функций, т.е. к развитию иммунодефицита. Чем активнее CD4+ клетки, тем активнее процесс репродукции вируса. ВИЧ угнетает преимущественно Т-хелперы -1 (связанные с многими цитокинами клеточного иммунитета), что способствует развитию вирусных инфекций и опухолей.

Сродство вирусного gp120 (gp105 в случае ВИЧ-2) к этому рецептору определяет высокую избирательность поражения клеток. В патологический процесс вовлекаются в первую очередь и в наибольшей степени CD4+ лимфоциты, моноциты крови и макрофаги тканей, дендритные клетки крови, лимфоузлов, селезенки, кожи, альвеолярные и интерстициальные макрофаги легких, микроглия и другие клетки нервной системы, имеющие CD4+ рецепторы. Поражаются также В- и 0- лимфоциты, ретикулярные клетки, эпителиальные клетки кишечника. Большое значение в распространении ВИЧ и длительному сохранению в организме придают клеткам Лангерганса.

В патогенезе ВИЧ - инфекции большое значение имеют механизмы иммунного повреждения. Наличие сходных участков в структуре белков gp120, HLA класса II и CD4 - рецепторов определяет перекрестное реагирование антител к ВИЧ с этими структурами с рядом патологических эффектов (блокада кооперации CD4+ лимфоцитов и HLA класса II, неадекватная стимуляция CD4+ клеток и др.).

Поражение иммунной системы при ВИЧ - инфекции носит системный характер, проявляясь глубокой супрессией Т- и В- звеньев иммунитета. Происходят изменения гиперчувствительности немедленного и замедленного типа, гуморального иммунитета и факторов неспецифической защиты. Наряду с дефицитом CD4+ лимфоцитов в динамике болезни нарастает функциональная недостаточность CD8+ лимфоцитов, NK клеток, нейтрофилов. Нарушение иммунного статуса проявляется рядом синдромов - инфекционным, аллергическим, аутоиммунным, лимфопролиферативным.

Манифестный синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) проявляется в трех основных клинических формах: нейроСПИД, онкоСПИД, инфектоСПИД

(оппортунистические инфекции). Это зависит от путей внедрения ВИЧ, его преимущественного тропизма к CD4 T- лимфоцитам или макрофагам, наличия кофакторов (цитомегаловирус, вирус Эпштейна- Барр), дозы инфекта, иммунного статуса организма и др.

В динамике ВИЧ- инфекции можно выделить следующие основные стадии: заражение, латентный период, появление лабораторных признаков инфекции, первичная клиника острой вирусной (ретровирусной) инфекции (эта стадия может отсутствовать), клинический СПИД (иммунодефицит плюс индикаторные болезни). Особое значение имеет выявление лабораторных признаков ВИЧ- инфекции.

Можно выделить *три типа инкубации*:

- вирусологическую (от инфицирования до определения в крови вируса или его антигенов) - в среднем 2 - 4 недели;

- серологическую (от заражения до сероконверсии - появления положительных серологических результатов) - в среднем 8 - 12 недель;

- СПИД - инкубацию (равно или более 10 лет). Безусловный иммунологический критерий СПИДа - снижение CD4+ лимфоцитов до 200 клеток в микролитре.

Лабораторная диагностика.

Лабораторная диагностика ВИЧ - инфекции методически базируется на ИФА, иммуноблоте и ПЦР. Основными ее направлениями являются:

- выявление антител к ВИЧ;

- выявление ВИЧ или его антигенов;

- определение изменений в иммунном статусе.

Для выявления антител применяют ИФА с различными тест - системами (лизатными, рекомбинантными, пептидными антигенами ВИЧ-1 и ВИЧ-2). Основная проблема - ложноположительные результаты (перекрестная реактивность gp120, CD4+ рецепторов, белков HLA II класса и др.). Поэтому исследования в ИФА проводят как правило с использованием параллельно нескольких различных тест - систем.

Иммуноблот чаще применяют как подтверждающий тест для выявления антител к отдельным белкам ВИЧ. Антитела к основным внутренним белкам (p17, p24) обнаруживают у 70% инфицированных и примерно у половины больных СПИДом. В иммуноблоте чаще всего выявляются антитела к gp41 (до 85%) и gp160 (до 100%).

В ранние сроки используют выявление в ИФА антигена p24. Наиболее чувствительным методом выявления ВИЧ является ПЦР - диагностика.

Основным клинико - лабораторным показателем диагностики СПИДа у ВИЧ - инфицированных является определение количества CD4+ лимфоцитов. Уровень ниже 200 клеток/мкл является основным критерием СПИДа.

Лечение является одним из наиболее актуальных и до настоящего времени не решенных проблем ВИЧ - инфекции. Теоретически наиболее оправдано применение препаратов, ингибирующих обратную транскрипцию - зидовудин, азидотимидин, диданозин, ставудин и др. Вакцины против ВИЧ находятся в стадии разработки. С учетом высокой изменчивости вируса это очень сложная задача.

Онковирусы. Вирусно-генетическая теория происхождения опухолей

В последние годы широкое распространение получила вирус-генетическая теория опухолей, предложенная в 1961 г. Л.А. Зильбером. Сущность ее заключается в том, что онкогенные вирусы, проникнув в клетку, оказывают на нее

трансформирующее действие путем включения генома вируса в геном клетки хозяина. Нуклеиновая кислота или ее фрагмент, включившись в геном клетки, меняет ее генотип и процессы метаболизма, делается частью генома клетки и вместе с ним передается по наследству. Клетка становится наследственно опухолевой. Вирусы выполняют роль инициатора, пускового момента и из зрелой опухоли исчезают бесследно, т.е. действуя по принципу «мавр сделал свое дело, мавр может удалиться».

В настоящее время установлена связь между вирусной инфекцией и последующей трансформацией клетки для вирусов, входящих в следующие семейства:

РНК-содержащие: семейство *Retroviridae*.

ДНК-содержащие: семейства *Papillomaviridae*, *Polyomaviridae*, *Adenoviridae* 12, 18, 31, *Herpadnaviridae*, *Herpesviridae*, *Poxviridae*

Наиболее хорошо изучен механизм вирусного онкогенеза у представителей РНК-содержащих вирусов семейства *Retroviridae*.

РНК-содержащие онкогенные вирусы.

Семейство *Retroviridae* включает 7 родов.

Онковирусы являются сложноорганизованными вирусами. Вирионы построены из сердцевин (диаметр 70—80 нм), окруженной липопротеиновой оболочкой с шипами. Размеры и формы шипов, а также локализация сердцевин служат основой для подразделения вирусов на 4 морфологических типа (А, В, С, D), а также вирус бычьего лейкоза.

Большинство онкогенных вирусов относится к типу С. Этот тип распространен среди рыб, пресмыкающихся, птиц, млекопитающих, включая человека. К типу В относятся вирусы, вызывающие рак молочной железы у мышей, а некоторые онковирусы обезьян принадлежат к типу D. Онковирусы типа D были выделены из перевиваемых клеток человека. Считают, что исходными клетками, в которых репродуцируется этот вирус, являются клетки HeLa (эти клетки были выделены из злокачественной опухоли женщины, погибшей от рака, Гелены Лайне).

Капсид онковирусов построен по кубическому типу симметрии. В него заключены нуклеопротеин и фермент ревертаза (обратная транскриптаза). От наличия этого фермента, осуществляющего обратную (лат. *retro* — обратный) транскрипцию, и произошло название семейства. Ревертаза обладает способностью транскрибировать ДНК как на матрице РНК, так и ДНК, а также нуклеазной активностью.

Геном представлен двумя идентичными позитивными цепями РНК, т. е. геном обладает диплоидностью. Обе молекулы РНК связаны на 5'-конце водородными связями. С 5'-концом каждой цепи связана тРНК клеточного происхождения, которая служит затравкой при транскрипции генома. Геном состоит из структурных и регуляторных генов. Последовательность структурных генов от 5'-конца к 3'-концу следующая: gag—pol—env. Gag кодирует синтез группоспецифических антигенов капсида, основными из которых являются белки капсида с р27—р30. Pol кодирует ревертазу. Env кодирует белки шипов оболочки.

Структурные гены с двух сторон ограничены длинными концевыми повторами, получившими название LTR (*long terminal repeat*, англ.), которые выполняют регуляторную функцию. В их состав входят сайты, связывающие затравку, которой является тРНК, и клеточные полимеразы. Кроме того, имеется ген-трансактиватор, являющийся усилителем транскрипции.

По краям LTR ограничены повторяющимися последовательностями, которые представляют участки узнавания в процессе интеграции провируса в геном клетки.

Онковирусы имеют очень сходную антигенную структуру. Группоспецифические антигены связаны с нуклеопротеидом, окруженным белковой оболочкой. Их выявляют с помощью иммунодиффузии, иммунной флюоресценции, РСК.

Типоспецифические антигены связаны с гликопротеидами и выявляются с помощью иммунодиффузии, иммунной флюоресценции, РСК и РН.

Все онкогенные РНК-содержащие вирусы чувствительны к эфиру, формалину, кислой среды (рН 4,5). Легко инактивируются при 56⁰С на протяжении 30 минут, сравнительно устойчивы к УФ-лучам и хорошо переносят минусовые температуры.

Онкогенные ДНК-вирусы дифференцируются друг от друга по величине, морфологии вириона, антигенной структуре, содержанием генетического материала.

Культивирование вирусов. Не культивируются на куриных эмбрионах, культивируются в организме чувствительных животных, а также культурах клеток.

Репродукция вирусов. Онковирусы проникают в клетку путем эндоцитоза. После освобождения из вакуоли нуклеокапсида начинает функционировать ревертаза. Этот процесс включает 3 этапа:

- синтез ДНК, на матрице РНК, при использовании тРНК в качестве затравки;
- ферментативное расщепление матричной РНК;
- синтез комплементарной нити ДНК на матрице первой нити ДНК.

Все три этапа осуществляются **ревертазой**. Благодаря наличию на LTR инвертированных повторов, линейная двухцепочечная ДНК замыкается в кольцо и интегрирует в ДНК клетки.

Транскрипция участков хромосомы, соответствующих геному провируса, осуществляется с помощью клеточной РНК-полимеразы 2.

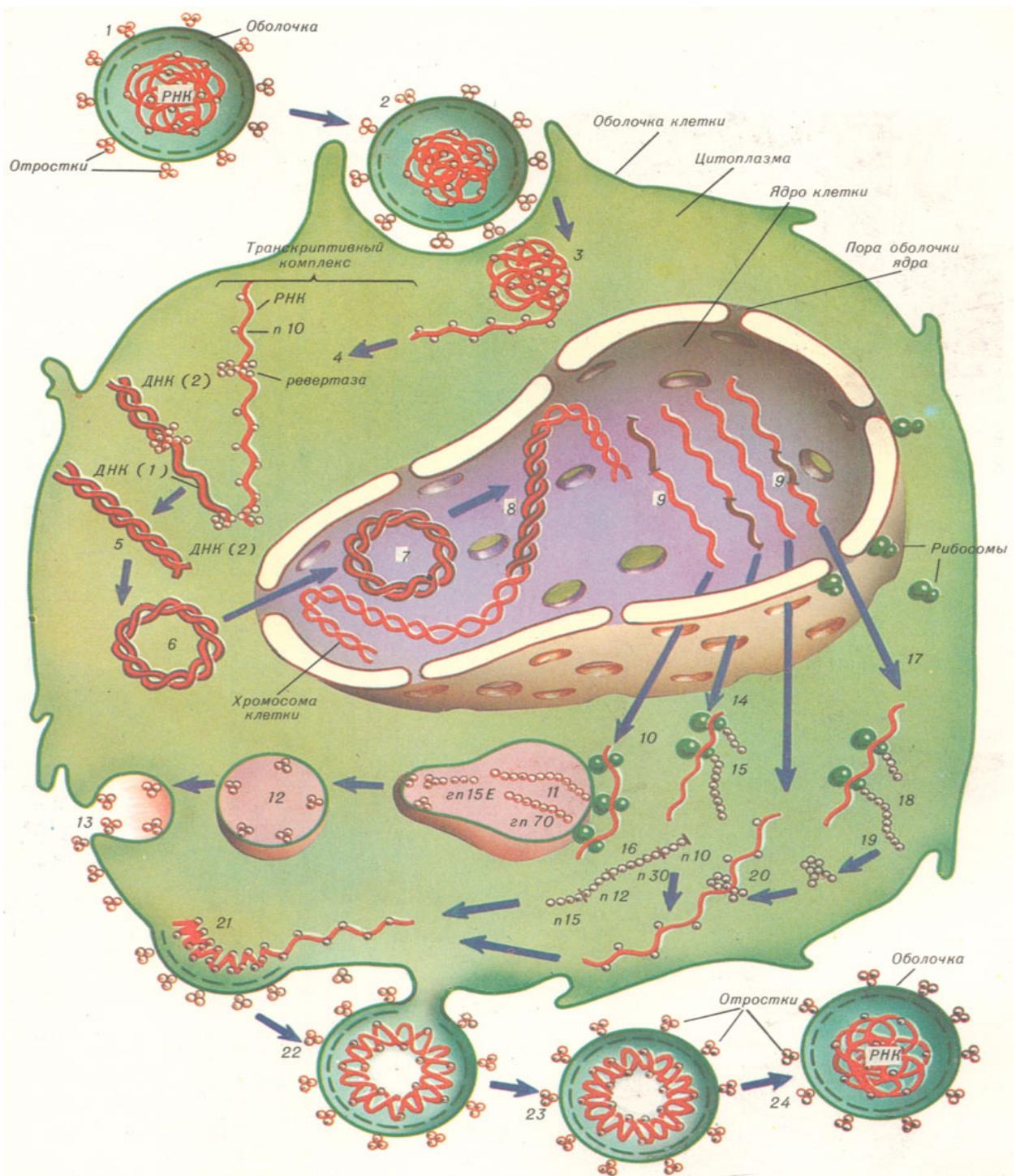


Рис. Внутриклеточный цикл развития онкогенного РНК - содержащего вируса (онковируса). На рисунке изображена клетка, в которой онкогенный РНК-содержащий вирус проходит внутриклеточный цикл размножения: 1—внеклеточный онковирус типа С; 2 — адсорбция и проникновение вириона онковируса типа С в клетку; 3 — депротенинизация ("раздевание") вириона; 4 — транскриптивный комплекс, обеспечивающий формирование одно-и двухспиральной вирусной ДНК (1), ДНК (2) на матрице РНК вируса; 5 — линейная двухспиральная ДНК вируса; 6 — кольцевая форма вирусной ДНК, образовавшаяся из линейной ДНК вируса; 7 — проникновение кольцевой формы вирусной ДНК в ядро клетки; 8 — интеграция вирусной ДНК в геном клетки; 9— синтез вирусной РНК; 10 — переход вирусной РНК из ядра клетки в цитоплазму и включение в состав полирибосомы, локализуемой на мембране гранулярного эндоплазматического ретикулума; 11 — синтез вирусных гликопротеидов — гп (гп15Е и гп70); 12 — транспорт вирусных гликопротеидов к

поверхности клетки; 13 — локализация вирусных гликопротеидов на плазматической оболочке клетки; 14 — переход вирусной РНК из ядра в цитоплазму и включение в состав линейной полирибосомы, синтезирующей белки вирусной сердцевинки (15), 16 — транспорт новосинтезированных белков (п10, п30, п12, п15) к поверхности клетки; 17 — переход вирусной РНК из ядра в цитоплазму и включение в состав линейной полирибосомы, синтезирующей ревертазу (18); 19 — транспорт вирусной ревертазы к поверхности клетки; 20 — транспорт вирусного рибонуклеопротеида к поверхности клетки; 21 — сборка сердцевинки онковируса; 22 — формирование онковируса из отдельных вирусных компонентов [гликопротеидов (11—13), белков сердцевинки (15, 16) и ревертазы (18, 7P)] в процессе почкования на поверхности клетки; 23 — превращение внеклеточного онковируса типа А, содержащего сферический нуклеоид, в онковирус типа С с плотным нуклеоидом (24)

Существуют две большие группы онковирусов: **эндогенные** и **экзогенные**.

Эндогенные онковирусы являются составными элементами генома всех органов и тканей организма человека и животных и передаются потомству от одного поколения другому, т. е. «вертикально», подобно обычным клеточным генам. Эндогенные онковирусы не являются онкогенными для представителей того вида животного, в клетках которого они находятся в виде постоянного генетического элемента.

Экзогенные онковирусы распространяются «горизонтально» от одной особи другой в форме вирионов.

Механизм онкогенеза, вызываемого онковирусами, связан с функционированием *onc*-генов, которые имеются в геноме всех клеток человека и животных. В нормальных здоровых тканях этот *onc*-ген находится в неактивном состоянии, в так называемой форме про-онкогена. В настоящее время известно более двух десятков *onc*-генов, функционирование которых приводит к трансформации клетки. Например, *src*-ген связан с развитием саркомы Рауса у кур, *ras*-ген опосредует развитие саркомы у крыс.

Включение в геном клетки ДНК-провируса может приводить к активации *onc*-гена, результатом чего будет развитие трансформации клетки. Кроме того, в процессе исключения ДНК-провируса из хромосомы клетки *onc*-ген может встроиться в вирусный геном и в составе вирусного генома попасть в новые клетки в активном состоянии.

Последовательность одного и того же протоонкогена может определять трансформирующую активность онковирусов разных животных.

Активация протоонкогена может быть результатом увеличения транскрипционной активности вследствие действия трансактиватора, расположенного на LTR генома провируса, а также результатом перестройки генетического материала, как следствие включения провируса в геном клетки.

Помимо онковирусов активацию протоонкогена могут вызвать мутагены, подвижные генетические элементы.

К семейству *Retroviridae* относится примерно 150 видов вирусов, вызывающих развитие опухолей у животных, и только 4 вида вызывают опухоли у человека: HTLV-1, HTLV-2, ВИЧ-1, ВИЧ-2.

Вирусы Т-клеточного лейкоза человека

К семейству *Retroviridae* роду *Deltaretrovirus* относятся вирусы, поражающие CD4 Т-лимфоциты, для которых доказана этиологическая роль в развитии опухолевого процесса у людей: HTLV-1 и HTLV-2

Вирус HTLV-1 (*human T-lymphotropic virus*) является возбудителем Т-клеточного лимфолейкоза взрослых. Вирус был изолирован в 1980 г. от больного Т-лимфомой. Он является экзогенным онковирусом, который, в отличие от других онковирусов, имеет два дополнительных структурных гена: *tax* и *gex*.

Продукт *tax*-гена действует на терминальные повторы LTR, стимулируя синтез вирусной иРНК, а также образование ИЛ-2 рецепторов на поверхности зараженной клетки.

Продукт *gex*-гена определяет очередность трансляции вирусных иРНК.

HTLV-2 был изолирован от больного волосисто-клеточным лейкозом. Отличается от HTLV-1 по группоспецифическим антигенам.

Оба вируса передаются половым, трансфузионным и трансплацентарным путями. Заболевания, вызываемые вирусами, характеризуются медленным развитием (инкубационный период — до 20 лет с момента заражения) и летальным исходом. Патогенез и течение инфекции напоминают таковые ВИЧ-инфекции, так как при обеих инфекциях поражается иммунная система. В крови у больных можно обнаружить антитела к вирусам. Заболевания встречаются среди представителей населения определенных географических регионов: в Сахаре, на Антильских островах, островах Юга Японии, а также в России (Восточная Сибирь, Дальний Восток). Эпидемиология Т-клеточных лейкозов изучена недостаточно. Специфическая профилактика и лечение не разработаны.

ДНК-содержащие онкогенные вирусы

Для многих ДНК-содержащих онкогенных вирусов механизмы вызываемого ими онкогенеза схожи. Это связано с тем, что большинство таких вирусов вызывают трансформацию непермиссивных клеток, т. е. тех клеток, в которых они не реплицируются с формированием нового поколения вирионов.

Существенным шагом в осуществлении онкогенеза ДНК-содержащими вирусами является экспрессия так называемых «ранних» генов. Эти гены кодируют набор белков, называемых Т- (англ. *tumor* — опухоль) антигенами, большинство из которых локализуется в ядре, но некоторые — в клеточной мембране.

В механизм онкогенеза, вызываемого ДНК-содержащими вирусами, также вовлечены клеточные белки, являющиеся продуктами опухоли-супрессирующих генов: p53 и Rb.

Белок p53 является супрессором опухолевого роста. Он представляет собой фосфопротеин, синтез которого усиливается в ответ на поврежденную ДНК. P53 активирует транскрипцию белка (WAF1), который, в свою очередь, связывает и инактивирует два важных циклина, усиливающих клеточное деление. Результатом деятельности белка p53 является ограничение деления клеток. Если же происходит репарация поврежденной ДНК, уровень p53 падает и клеточное деление восстанавливается.

Rb (англ. *retinoblastome* — ретинобластома) ген кодирует белок, который осуществляет контроль клеточной пролиферации.

Семейство Papillomaviridae включает в себя вирусы папилломы человека, кроликов, коров, собак.

Вирусы папилломы человека вызывают продуктивную инфекцию только в дифференцированных клетках плоского эпителия. Размножающиеся клетки базального слоя не способны к поддержанию полного репродуктивного цикла.

Насчитывается более 100 типов вируса папилломы человека, большинство из которых вызывает образование доброкачественных бородавок, папиллом и кондилом в области половых органов, ануса, на слизистых оболочках дыхательных путей и пищеварительного тракта, а также на коже. В клетках этих образований ДНК вируса находится в ядре в виде независимой от генома клетки плазмидной формы кольцевой двухцепочечной ДНК.

Определенные типы вируса папилломы человека, в частности типы 2, 5, 8, способны вызвать рак кожи, злокачественные опухоли в полости рта, гортани. Типы 16 и 18 почти в 100% случаев являются возбудителями рака шейки матки.

В раковых клетках вирусная ДНК интегрирована в клеточную. Канцерогенез связан с экспрессией белков E6 и E7, которые инактивируют супрессирующие опухолевый рост белки p53 и Rb.

Семейство Polyomaviridae (от лат. *poly* — много, *oma* — опухоль), а также вакуолизирующий вирус обезьян SV-40 различаются между собой по антигенным свойствам.

Полиомавирусы и вирус SV-40 имеют одинаковый механизм онкогенеза. Эти вирусы вызывают продуктивную инфекцию в клетках природных хозяев. При инфицировании новорожденных животных других видов или гетерологических культур клеток они стимулируют образование опухолей широкого гистологического спектра.

В трансформированных клетках вирусная ДНК интегрирована в клеточную и экспрессирует только ранние белки. Некоторые из них, в частности Т-антиген, препятствуют связыванию белка p53 с клеточной ДНК.

Известны два вируса полиомы человека: ВК, изолированный из мочи больного, с трансплантацией почки и JC.

Вирус JC был выделен из мозга человека, страдающего прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатией — заболевания, характеризующегося демиелинизацией белого вещества мозга и встречающегося у лиц с пониженным Т-клеточным иммунитетом. Вирус JC способен вызвать развитие опухолей мозга у обезьян и новорожденных хомячков.

Вакуолизирующий вирус SV-40 был обнаружен в культуре клеток почки макаки-резуса, в которой он не вызывал ни ЦПД, ни трансформации. При заражении этим вирусом культуры клеток из почки зеленой мартышки он вызвал вакуолизацию и гибель клеток. SV-40 вызывает также развитие опухолей у хомячков, крыс и обезьян-мармозеток.

Вирус SV-40 не обладает онкогенным эффектом в отношении человека. Об этом свидетельствуют наблюдения за десятками миллионов лиц, которым в детстве (в первые годы массовых прививок против полиомиелита) был введен этот вирус, так как им были контаминированы культуры клеток почки макаки-резуса, на которых получали вакцину. Тщательные наблюдения за этим контингентом, а также за добровольцами из США, которые были инфицированы SV-40, показали, что вирус вызывает у человека бессимптомное носительство, стимулирует образование антител, но не вызывает опухолеродного эффекта.

Семейство Adenoviridae. Некоторые аденовирусы человека, особенно серотипы 12, 18 и 31, индуцируют саркомы у новорожденных хомячков и трансформируют культуры клеток грызунов. Механизм онкогенеза аналогичен таковому у полиомавирусов, за исключением того факта, что в непермиссивных клетках не вся ДНК вируса, а только 10 % генома интегрирует в ДНК-клетки, экспрессируя при этом Т-антиген опухоли. По химической структуре Т-антиген относится к фоспротеину. Т-антиген формируется в ядре на ранних этапах репликационного цикла перед началом синтеза вирусной ДНК и белков вирусного капсида. Выявление этого антигена проводится методами иммунофлюоресценции или РСК при помощи антител, накапливающихся в сыворотке крови животных, у которых имеются первичные или трансплантационные опухоли.

Данные о способности аденовирусов вызывать онкогенез у человека отсутствуют.

Вирус гепатита В. ВГВ вызывает развитие первичного рака печени. Опухоль развивается у хронических носителей вируса, у которых вирусная ДНК интегрирована в геном гепатоцита. Онкогенез связывают с возможностью интеграции вирусной ДНК в район сильного промотора, в результате чего начинается синтез и накопление НВх-антигена, который обладает способностью связывать супрессор опухолевого роста р53. У больных первичной злокачественной опухолью печени HbsAg встречаются в сыворотке крови в 95% случаев.

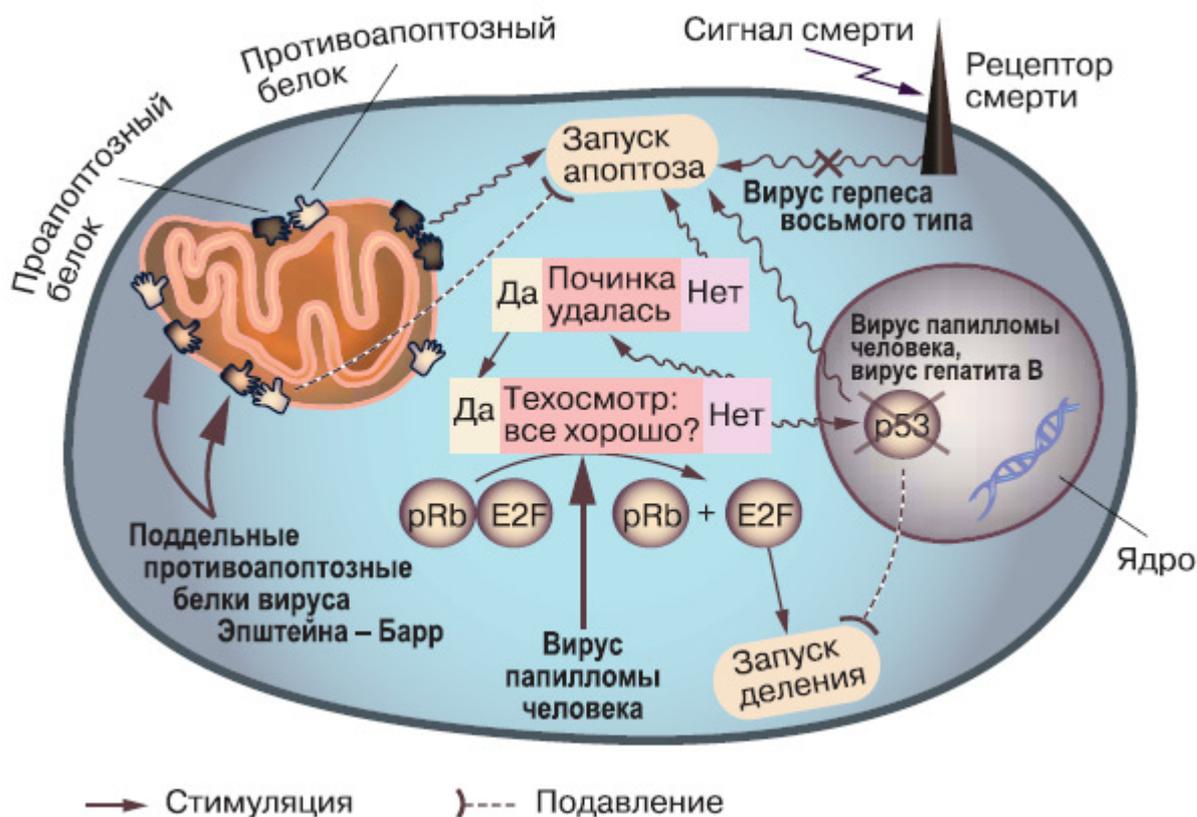
Семейство Poxviridae. В состав семейства входят вирусы фибромы-миксомы кролика, вирус Ябы, вызывающий развитие опухолей у обезьян, и вирус контагиозного моллюска, патогенный для человека. Этот вирус вызывает образование эритематозных узелков, локализующихся на коже лица, шеи, век, половых органов. Болезнь передается при прямом и половом контакте.

Семейство Herpesviridae. Различные представители семейства вызывают лимфомы у обезьян, карциному почки у лягушки (болезнь Люке), нейролимфому у цыплят (болезнь Марека).

Онкогенез у человека связан с вирусом простого герпеса 2 типа (ВПГ-2) и вирусом Эпштейна—Барр (ВЭБ).

Вирус простого герпеса 2 (ВПГ-2) у людей передается половым путем и связывают его с развитием рака шейки матки у женщин. Эта корреляция основана на результатах эпидемиологических обследований, показывающих взаимосвязь между половым герпесом у женщин и последующим инвазионным раком шейки матки. Изучение клеток, трансформированных ВПГ-2, показало, что в них находится не весь геном вируса, а только небольшие его фрагменты. Кроме того, у больных раком шейки матки женщин обнаруживаются антитела к ВПГ-2 чаще, чем у здоровых женщин. **С вирусом герпеса ЭБ (Эпштейна-Барра)** связывают лимфомы Беркитта — опухоли верхней челюсти, встречающейся у детей и юношей в странах Африки, и карциномы носоглотки, которые, в основном, поражает мужское население в некоторых районах Китая. В клетках опухолей обнаруживаются множественные копии интегрированного генома вируса. В ядрах пораженных клеток выявляется ядерный антиген ВЭБ. В крови больных вначале появляются антитела к капсидному антигену, а позже — к мембранному и ядерному антигенам ВЭБ. Вирус обладает тропизмом к лимфоидным клеткам, в частности, к В-лимфоцитам человека. Антитела по отношению к антигенам вируса ЭБ у больных выявляются при помощи иммунофлюоресценции или РСК. Иммунологические исследования, проведенные у больных раком предстательной

железы, позволили установить, что трансформация нормальных клеток в злокачественные обуславливается вирусом цитомегалии.



Вирусы, вызывающие рак, могут отключать апоптоз и способствовать делению, воздействуя на ключевые точки регуляции (подробности в тексте). Каждый вирус делает это по-своему, но все они добиваются бессмертия и вечного деления клетки-хозяина.

Рекомендации по оформлению протокола

- Студенты изучают и записывают в протокол классификацию ретровирусов
- Студенты рассматривают и заносят в протокол схему лабораторной диагностики ВИЧ/СПИДа
 - Проводят учет реакции ИФА, поставленной с целью скрининговой серологической диагностики ВИЧ-инфекции
 - Студенты характеризуют и заносят в протокол основные препараты, которые используются для лечения ВИЧ/СПИДА

Классификация ретровирусов (семейство Retroviridae)

Род	Представители
Alpharetrovirus	Вирусы лейкоза, саркомы птиц, саркомы Рауса кур
Betaretrovirus	Вирус рака молочных желез мышей, эндогенный ретровирус человека, вирус обезьян Мезон-Пфайзера

Gammaretrovirus	Вирусы саркомы и лейкемии мышей, котов, приматов
Deltaretrovirus	Вирус лейкемии крупного рогатого скота, лимфотропный вирус Т-лимфоцитов человека (HTLV - 1,2)
Epsilonretrovirus	Вирус саркомы кожи
Lentivirus	ВИЧ, вирус Меде/Висна, анемии коней
Spumavirus	«Пенящий» вирус человека (вакуолизирует клетки), бычий синцитиальный вирус

Задание 1. Занести в протокол схему лабораторной диагностики ВИЧ/СПИДа.

Схема лабораторной диагностики ВИЧ/СПИДА

Обнаружение ВИЧ или его компонентов в материале от больных	Выявление противовирусных антител	Выявление специфических изменений в иммунной системе
<i>полимеразная цепная реакция</i>	<i>непрямой иммуноферментный анализ</i>	<i>определение количества Т4-клеток</i>
<i>иммуноферментный анализ</i>	<i>вестернблот (имуноблот)</i>	<i>определение соотношения Т-хелперов и Т-супрессоров</i>
<i>выделение ВИЧ из клинического материала на культурах клеток лимфоцитов</i>	<i>реакция иммунофлюоресценции</i>	<i>определение количества интерлейкина-2 и γ-интерферона</i>
	<i>реакция латексагглютинации</i>	
<i>электронная микроскопия</i>	<i>реакция радиоиммунопреципитации</i>	

Основные препараты, используемые для лечения ВИЧ/СПИДА.

1. Ингибиторы обратной транскриптазы нуклеозидной природы (зидовудин, ламивудин, ставудин и др.).
2. Ингибиторы обратной транскриптазы ненуклеозидной природы (невирапин, делавирдин и др.).
3. Ингибиторы протеазы (индинавир, ритонавир, АВТ- 378).

Вопросы для самоконтроля.

- Каково строение вирусов иммунодефицита человека?
- Какие ферменты имеет ВИЧ?
- С какими рецепторами клетки взаимодействует ВИЧ?
- Какие физические факторы являются губительными для ВИЧ?
- Какие нарушения клеточного иммунитета наблюдаются у больных СПИДом?
- Каковы механизмы передачи ВИЧ?
- В каких биологических жидкостях обнаруживаются антитела к ВИЧ?

Практическое занятие №20
Тема: "Итоговый модульный контроль 1"

ПЕРЕЧЕНЬ ВОПРОСОВ К ИТОГОВОМУ МОДУЛЬНОМУ КОНТРОЛЮ 1

МОДУЛЬ 1. Морфология, физиология и генетика микроорганизмов.

Антибиотики. Инфекция. Иммуитет. Общая и специальная вирусология.

Содержательный модуль 1. Введение в микробиологию.

1. Определение микробиологии как науки. Отрасли микробиологии. Предмет и задачи медицинской микробиологии. Основные черты и тенденции развития современной микробиологии.

2. Открытие микроорганизмов А. Левенгуком. Этапы развития микробиологии. Вклад Л. Пастера и Р. Коха в микробиологию.

3. Становление основных направлений микробиологической науки. Роль Д.Самойловича, Э. Дженнера, И. И. Мечникова, Д. И. Ивановского, П. Эрлиха, С.М.Виноградского, Э. Беринга, Г. Рамона, Ф.А.Леша, Г. Домагка, А. Флеминга, Д.К.Заболотного, Л. А. Зильбера, В. М. Жданова, М. П. Чумакова, Ф. Бернета и других ученых. Развитие микробиологии в Украине.

Содержательный модуль 2. Морфология и структура прокариотов и паразитических одноклеточных эукариотов. Окраска микроорганизмов. Микроскопия.

1. Основные отличия прокариотов и эукариотов. Формы бактерий с дефектом синтеза клеточной стенки, протопласты, сферопласты. L -формы бактерий.

2. Морфология и строение бактерий. Роль отдельных структур в жизнедеятельности бактерий и в патогенезе инфекционных заболеваний. Вегетативные формы и споры.

3. Морфология и классификация простейших.

4. Классификация и морфология грибов.

5. Методы микроскопии. Изготовление бактериологических препаратов. Красители и красящие растворы, простые и сложные методы окрашивания.

6. Принципы организации, аппаратура и режим работы бактериологической, серологической и вирусологической лабораторий.

7. Бактериоскопический метод исследования. Этапы.

Содержательный модуль 3. Физиология микроорганизмов (прокариотов). Эволюция и классификация микроорганизмов.

1. Типы и механизмы питания микроорганизмов. Механизмы проникновения питательных веществ в бактериальную клетку. Химический состав микроорганизмов. Значение отдельных компонентов. Питательные среды, требования к ним. Классификация питательных сред, используемых в микробиологии.

2. Дыхание микроорганизмов. Аэробный и анаэробный типы дыхания. Ферменты и структуры клетки, которые участвуют в процессе дыхания. Методы выращивания анаэробных бактерий.

3. Ферменты микроорганизмов, их роль в обмене веществ. Использование для дифференциации бактерий. Ферменты патогенности.

4. Рост и способы размножения бактерий. Механизм клеточного деления, фазы размножения культуры бактерий в стационарных условиях.

5. Бактериологический метод исследования. Принципы выделения чистых культур бактерий и их идентификации.

6. Влияние физических, химических и биологических факторов на микроорганизмы. Стерилизация, методы, контроль эффективности стерилизации. Асептика. Антисептика.

7. Происхождение и эволюция микроорганизмов. Современная классификация прокариотов. Основные таксоны. Систематика и номенклатура бактерий. Вид как основная таксономическая единица.

8. Систематика и номенклатура бактерий. Основные принципы систематики. Классификация бактерий. Характеристика вида.

Содержательный модуль 4. Генетика микроорганизмов.

1. Материальные основы наследственности микроорганизмов. Генотип и фенотип. Виды изменчивости. Ненаследственная изменчивость.

2. Наследственная изменчивость. Мутации, их разновидности. Мутагены физические, химические, биологические. Генетические рекомбинации: трансформация, трансдукция, конъюгация. Диссоциация бактерий.

3. Внехромосомные факторы наследственности бактерий. Плазмиды, их основные генетические функции. Мигрирующие элементы. Роль мутаций, рекомбинаций и селекции в эволюции микробов. Основные факторы эволюции.

4. Значение генетики в развитии общей и медицинской микробиологии, вирусологии, молекулярной биологии. Микробиологические основы генной инженерии. Схема получения генных структур и наследственно измененных организмов. Достижения генной инженерии, использование генноинженерных препаратов в медицине.

Содержательный модуль 5. Микробиологические основы антимикробной химиотерапии.

1. Химиотерапия и химиотерапевтические препараты. Химиотерапевтический индекс. Механизм антибактериального действия сульфаниламидов. Роль П. Эрлиха и Г. Домагга в развитии учения о химиотерапии.

2. Явление антагонизма у микробов. Роль отечественных микробиологов в развитии учения об антагонизме микробов. Антибиотики, характеристика, принципы получения, единицы измерения. Классификация по механизму действия на микроорганизмы.

3. Лекарственная устойчивость микробов, механизм образования устойчивых форм. Методы определения чувствительности микробов к антибиотикам. Минимальная угнетающая (МУК) и минимальная бактерицидная (МБК) концентрации. Практическое значение. Принципы борьбы с лекарственной устойчивостью микроорганизмов.

Содержательный модуль 6. Инфекция.

1. Инфекция. Факторы, обуславливающие возникновение инфекционного процесса. Роль микроорганизмов в инфекционном процессе. Патогенность, вирулентность, единицы измерения, методы определения. Факторы патогенности микроорганизмов, их характеристика.

2. Токсины микробов (экзо- и эндотоксины). Свойства и химический состав, получение, измерение силы экзотоксинов. Роль в патогенезе и иммуногенезе инфекционных заболеваний.

3. Фазы развития инфекционного процесса. Механизмы заражения патогенными микроорганизмами. Бактериемия, токсинемия, сепсис. Периоды инфекционной болезни.

4. Роль макроорганизма в инфекционном процессе. Иммунологическая реактивность организма ребенка. Влияние окружающей среды и социальных условий на возникновение и развитие инфекционного процесса у человека. Персистенция бактерий и вирусов. Понятие о рецидиве, реинфекции, суперинфекции.

Содержательный модуль 7. Иммунная система организма. Реакции неспецифической защиты организма от микроорганизмов.

1. Учение об иммунитете. Этапы развития иммунологии. Виды иммунитета и формы его проявления.

2. Неспецифические факторы защиты организма от патогенных микробов. Комплемент, его свойства, пути активации. Цитокины. Фагоцитоз, виды фагоцитирующих клеток. Стадии фагоцитоза. Завершенный и незавершенный фагоцитоз.

3. Иммунная система организма, ее органы. Роль тимуса (вилочковой железы) в иммунном ответе. Клетки иммунной системы, их разновидности, взаимодействие Т-, В-лимфоцитов и макрофагов. Их роль в клеточном и гуморальном иммунитете.

4. Закономерности иммунного ответа организму. Фазы иммунного ответа. Иммунологические реакции. Иммунологическая толерантность, причины ее возникновения. Иммунологическая память, ее механизм.

5. Гиперчувствительность немедленного и замедленного типа, их механизмы, отличия. Практическое значение.

6. Трехклеточная схема кооперации иммунного ответа. Роль отдельных клеток иммунной системы, их взаимодействие. Интерлейкины.

Содержательный модуль 8. Антигены. Антитела.

1. Антигены, их характеристика. Полноценные и неполноценные антигены. Антигенная структура бактерий. Практическое значение учения об антигенах микробов. Аутоантигены.

2. Антитела, их природа. Место синтеза, динамика продукции антител. Аутоантитела.

3. Антитоксины, их свойства, механизм действия. Принципы получения антитоксических сывороток. Единицы измерения, практическое использование.

4. Серологические реакции, их характеристика, основные типы, практическое использование. Реакция агглютинации, ее механизм, разновидности. Практическое использование.

5. Серологические реакции. Реакция преципитации, ее механизм. Использование в медицинской практике. Реакция преципитации в геле.

6. Серологические реакции. Реакции лизиса. Реакция связывания комплемента, ее практическое использование.

7. Реакции с мечеными антителами или антигенами. Практическое использование реакции иммунофлюоресценции (РИФ), иммуноферментного и радиоиммунного анализа.

Содержательный модуль 9. Реакции иммунитета. Иммунопатология.

1. Формы и типы иммунного реагирования. Гуморальный иммунный ответ и его этапы.

2. Первичный и вторичный иммунный ответ. Взаимодействие клеток иммунной системы в процессе иммунного ответа.
3. Реакции иммунного ответа, их характеристика. Клеточный иммунный ответ.
4. Гиперчувствительность немедленного и замедленного типа. Механизм развития этих реакций.
5. Моноклональные антитела, их получение и использование в медицинской практике.
6. Иммунодефицитные состояния, аутоиммунные процессы. Комплексная оценка иммунного статуса организма.
7. Живые вакцины, принципы получения. Контроль, практическое использование живых вакцин, оценка эффективности.
8. Вакцины. История получения. Классификация вакцин. Корпускулярные, химические, синтетические, генноинженерные и антиидиотипические вакцины.
9. Химические вакцины и анатоксины, принципы получения. Ассоциируемые вакцины. Адсорбируемые вакцины, принцип "депо".
10. Анатоксины, их получение, очистка, единицы измерения, использование, оценка.
11. Корпускулярные вакцины из убитых микробов. Принципы получения, контроль, оценка эффективности.

Содержательный модуль 10. Общая вирусология.

1. История открытия и главные этапы развития вирусологии. Вклад отечественных ученых. Методы изучения вирусов, их оценка.
2. Морфология и ультраструктура вирусов. Типы симметрии вирусов. Химический состав, функции составных частей вирусов.
3. Бактериофаг, история изучения. Структура, классификация фагов по морфологии. Методы качественного и количественного определения бактериофагов. Практическое использование бактериофагов.
4. Формы взаимодействия бактериофагов с бактериальной клеткой. Вирулентные и умеренные фаги. Характеристика продуктивного взаимодействия. Лизогения и фаговая конверсия.
5. Современные взгляды на природу и происхождение вирусов. Место вирусов в системе живого.
6. Принципы классификации вирусов. Основные свойства вирусов человека и животных.
7. Методы культивирования вирусов и их оценка.
8. Реакции вирусной гемагглютинации и гемадсорбции. Механизм, практическое значение, использование, диагностическая ценность.
9. Серологические реакции, используемые в вирусологии. Реакция вируснейтрализации, механизм, принципы использования, диагностическая ценность.
10. Реакция торможения гемагглютинации, ее механизм, условия постановки, принципы использования, диагностическая ценность.
11. Реакция связывания комплемента, ее суть, оценка. Особенности постановки реакции связывания комплемента при вирусных инфекциях.
12. Реакции с мечеными антителами и антигенами в вирусологии. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).

13. Использование культур клеток в вирусологии. Классификация культур клеток. Питательные среды для культивирования клеток.
14. Виды взаимодействия вирусов и клеток. Характеристика продуктивного взаимодействия, этапы.
15. Особенности патогенеза вирусных инфекций. Острая и персистентная вирусные инфекции.
16. Иммунологические особенности вирусных инфекций. Факторы противовирусного иммунитета.
17. Методы выявления вирусов в культуре клеток и их оценка. Цитопатическое действие вирусов, его виды.
18. Неспецифические факторы защиты макроорганизма от вирусных агентов, их характеристика. Интерфероны, механизм действия, интерферогены.
19. Вирусные вакцины, классификация, принципы получения, требования к ним, контроль, оценка эффективности.

Содержательный модуль 11. Специальная вирусология.

1. Семейство Ортомиксовирусов. История открытия, биологические свойства, классификация.
2. Методы лабораторной диагностики гриппа и их оценка.
3. Антигенное строение и виды антигенной изменчивости вируса гриппа. Современные гипотезы, которые объясняют антигенную изменчивость ортомиксовирусов.
4. Патогенез и иммунитет при гриппе. Роль специфических и неспецифических механизмов в противогриппозном иммунитете.
5. Проблема специфической профилактики и терапии гриппа. Препараты и их оценка.
6. Семейство Парамиксовирусов, общая характеристика семейства. Парагриппозные вирусы, их биологические свойства. Роль в развитии патологии человека. Лабораторная диагностика парагриппозных инфекций.
7. Вирус кори, биологические свойства, культивирования. Патогенез инфекции. Лабораторная диагностика, специфическая профилактика.
8. Вирус эпидемического паротита. Патогенез инфекции. Лабораторная диагностика, специфическая профилактика паротита.
9. Семейство Парамиксовирусов. Общая характеристика. Респираторно-синцитиальный вирус. Биологические свойства, роль в развитии патологии человека. Методы диагностики заболеваний, вызванных РС-вирусами.
10. Семейство Пикорнавирусов, общая характеристика. Антигенное строение. Биологические особенности вирусов Коксаки, свойства. Значение в развитии патологии человека.
11. Вирусы полиомиелита, характеристика, классификация. Патогенез и иммуногенез инфекции. Лабораторная диагностика, специфическая профилактика. Проблема ликвидации полиомиелита во всем мире.
12. Род Энтеровирусов, общая характеристика, классификация. Лабораторная диагностика энтеровирусных инфекций.
13. Род Риновирусов, биологические свойства. Классификация. Роль в патологии человека. Методы лабораторной диагностики инфекций, вызванных риновирусами.

14. Семейство Рабдовирусов. Вирус бешенства, биологические свойства. Патогенез заболевания. Лабораторная диагностика. Дифференциация фиксированного и дикого вируса бешенства. Специфическая профилактика бешенства.
15. Общая характеристика экологической группы арбовирусов. Вирусы клещевого и японского энцефалита. История открытия и изучение этих вирусов. Биологические свойства, методы лабораторной диагностики, специфическая профилактика.
16. Род Рубивирусов. Вирус краснухи. Биологические свойства. Патогенез заболевания, иммунитет. Лабораторная диагностика, специфическая профилактика.
17. Семейство Ретровирусов, биологические свойства. Классификация. Механизм вирусного канцерогенеза.
18. Семейство Герпесвирусов, биологические свойства, значения в развитии патологии человека. Лабораторная диагностика заболеваний. Генетические методы диагностики.
19. Семейство Аденовирусов. Биологические свойства. Антигенное строение. Культивирование. Патогенез и лабораторная диагностика аденовирусных инфекций. Иммунитет. Специфическая профилактика.
20. Вирус натуральной оспы. Патогенез инфекции. Методы диагностики и специфической профилактики. Вирус осповакцины. Ликвидация оспы во всем мире.
21. Возбудители вирусного гепатита, свойства и классификация вирусов. Патогенез заболеваний. Лабораторная диагностика. Перспективы специфической профилактики.
22. Онкогенные вирусы, классификация. Вирусно-генетическая теория возникновения опухолей Л. О. Зильбера. Механизмы вирусного канцерогенеза.
23. Вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ). Свойства. Роль в патологии человека. Патогенез СПИДа. Методы лабораторной диагностики (иммунологические, генетические). Перспективы специфической профилактики и терапии.
24. Кардиовирусы. Общая характеристика.
25. Прионы. Свойства. Прионовые заболевания животных (скрепи, губчатая энцефалопатия коров) и человека (куру, болезнь Крейтцфельда-Якоба и др.). Патогенез прионовых заболеваний. Диагностика.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРАКТИЧЕСКИХ РАБОТ И ЗАДАНИЙ К ИТОГОВОМУ МОДУЛЬНОМУ КОНТРОЛЮ 1.

МОДУЛЬ 1. Морфология, физиология и генетика микроорганизмов.

Антибиотики. Инфекция. Иммунитет. Общая и специальная вирусология.

1. Провести микроскопию препарата с использованием иммерсионного объектива, сделать вывод о морфологических свойствах исследуемых микроорганизмов.
2. Приготовить бактериальный препарат, окрасить по методу Грама, осуществить микроскопию с использованием иммерсионного объектива, сделать вывод о чистоте исследуемой культуры микроорганизмов.
3. Описать культуральные свойства колоний микроорганизмов, выросших на поверхности МПА. Обосновать последующий ход исследования.

4. Описать свойства колоний микроорганизмов, выросших на среде Эндо. Найти колонии, характерные для *E. coli*. Объяснить суть использования дифференциально-диагностических сред с углеводами.
5. Обосновать суть вакцинопрофилактики. Подобрать 2-3 живых вакцины, объяснить принципы их изготовления и использования.
6. Обосновать суть вакцинопрофилактики. Подобрать 2-3 убитых вакцины, объяснить принципы их изготовления и использования.
7. Объяснить суть антитоксического иммунитета. Подобрать препараты для создания активного антитоксического иммунитета.
8. Объяснить суть антитоксического иммунитета. Подобрать препараты для создания пассивного антитоксического иммунитета.
9. Подобрать препараты, которые используют для специфической профилактики и терапии дифтерии, объяснить аспекты их использования.
10. Объяснить суть иммуноферментного метода исследований. Осуществить учет ИФА, поставленной с целью серологической диагностики ВИЧ - инфекции.
11. Объяснить суть серологической идентификации микроорганизмов. Подобрать препараты, которые используют с этой целью. Принципы их получения.
12. Объяснить суть серологической диагностики инфекционных заболеваний. Подобрать препараты, которые используют с этой целью. Принципы их получения.
13. Объяснить суть вирусологической диагностики гриппа. Осуществить учет реакции гемагглютинации (РГА), поставленной с целью выявления вируса. Сделать вывод о наличии и титре вируса.
14. Объяснить суть вирусологической диагностики гриппа. Осуществить учет реакции торможения гемагглютинации (РТГА), поставленной с целью серологической идентификации выделенного вируса. Сделать вывод о типе вируса.
15. Осуществить серологическую диагностику гриппа. Провести учет реакции торможения гемагглютинации (РТГА), поставленной с парными сыворотками больного. Сделать обоснованный вывод.
16. Объяснить суть вирусологической диагностики полиомиелита. Установить наличие вируса в клеточных культурах, инфицированных материалом от больного, по цитопатогенному действию (ЦПД) и феномену бляшкообразования. Сделать вывод.
17. Объяснить суть вирусологической диагностики полиомиелита. Осуществить учет реакции вируснейтрализации (РН), поставленной с целью серологической идентификации вируса, выделенного от больного. Сделать вывод о виде вируса.
18. Объяснить суть вирусоскопической диагностики вирусных заболеваний. Осуществить микроскопию препарата, изготовленного из мозговой ткани, для выявления телец Бабеша-Негри.

Рекомендованная литература.

Основная:

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология; М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005, 734 с.
2. Воробьев А. А., Кривошеин Ю. С., Ширококов В. П. Медицинская и санитарная микробиология: учебное пособие.— М., 2008.-462 с.
3. Ширококов В. П., Янковский Д. С., Дымент Г. С. Микробная экология человека с цветным атласом : учеб. пособие для студ. высш. мед. учеб. заведений IV уровня аккредитации и врачей-интернов / В. П. Ширококов, - К. : Червона рута-Турс, 2010. – 336 с.

Дополнительная:

4. Medical microbiology / edited by Samuel Baron, MD. - 4th ed. The University of Texas Medical Branch and Galveston, 1996, 1273 p.
5. W.Levinson, E.Jawetz. Medical microbiology and immunology: examination and board review, 6th ed. The McGraw - Hill Companies, 2000, 582 p.
6. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования; М., 1983.
7. Красильников А. П. Микробиологический словарь-справочник.- Минск, 1986.
8. Климнюк С.І., Ситник І.О., Творко М.С. Практична мікробіологія: Посібник.-Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 440 с.
9. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія: підручнтк для студентів вищ.мед.навч.закл. /Під редакцією В.П. Ширококова.- Вінниця: Нова Книга, 2010. - 969 с.